

UNIVERSITE DE LYON
FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1963 N° 502

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU DOSAGE CHIMIQUE DE L'ALDOSTERONE URINAIRE

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon, Section de Pharmacie
présentée et soutenue publiquement
devant LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

le 27 Juin 1963

par

Jean Claude LÉCHEVIN

Né le 4 Novembre 1933, à RIORGES (Loire)

Travail du Laboratoire de Chimie Analytique Pharmaceutique
de la Faculté et du Laboratoire de la Pharmacie de l'Hôpital
de l'Antiquaille.

F. ANDRÉ
5 rue Bugeaud

Lyon

UNIVERSITE DE LYON
FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1963 N° 502

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU DOSAGE CHIMIQUE DE L'ALDOSTERONE URINAIRE

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon, Section de Pharmacie
présentée et soutenue publiquement
devant LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

le 27 Juin 1963

par

Jean Claude LÉCHEVIN

Né le 4 Novembre 1933, à RIORGES (Loire)

Travail du Laboratoire de Chimie Analytique Pharmaceutique
de la Faculté et du Laboratoire de la Pharmacie de l'Hôpital
de l'Antiquaille.

F. ANDRÉ
5 rue Bugeaud

Lyon



Faculté Mixte de Médecine
et de Pharmacie de LYON

PERSONNEL DE LA FACULTE

M. J. LEPINE : Doyen Honoraire
Membre de l'Institut

M. H. HERMANN : Doyen
Correspondant de
l'Institut

MM. M. LEVRAT, Assesseur
L. REVOL, Assesseur

Professeurs Honoraires

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND,
MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY, DUCLOS,
GUILLEMINET.

Professeurs

MM.

HERMANN	Physiologie A
CIBERT	Clinique urologique
PONTHUS (détaché à Beyrouth)	Physique Biologique
DECHAUME	Clinique neuro-psychiatrique et hygiène mentale
ROCHET	Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire
CHAMBON	Chimie organique et toxicologie
WERTHEIMER	Clinique chirurgicale B
PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B
FROMENT	Clinique et prophylaxie cardio-vascu- laires
CROIZAT	Clinique médicale C
ENSELME	Chimie biologique et médicale
MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A
REVOL	Pharmacie galénique et matière médicale
POLLOSSON	Clinique gynécologique
PIGEAUD	Clinique obstétricale
BOURRET	Médecine du travail
LEVRAT	Clinique médicale A
SOHIER	Hygiène et action sanitaire et sociale
BERNHEIM	Clinique médicale infantile et hygiène du premier âge
JOURDAN	Biologie médicale et pharmacodynamie
NETIEN	Botanique et cryptogamie
BERTRAND	Clinique chirurgicale C
BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique

MM.

DREVON	Pharmacie chimique et pharmacologie
ROCHE	Médecine légale et déontologie
COUDERT	Parasitologie et pathologie exotique
MOUNIER-KUHN	Clinique d'Oto-rhino-laryngologie et d'audio-phonologie
PAUFIQUE	Clinique ophtalmologique
THIERS	Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie
BRUN	Clinique de pneumo-phtisiologie
CREYSSEL	Clinique traumatologique des membres
DARGENT	Clinique carcinologique
GUICHARD	Anatomie pathologique
GIRARD Paul	Pathologie générale et expérimentale
LATARJET	Anatomie
PEYCELON	Pathologie chirurgicale
GIRARD Marcel	Thérapeutique
VACHON	Pathologie médicale
GALY	Physio-Pathologie des voies respiratoires
PAPILLON	Radiologie
JEUNE	Clinique des maladies infectieuses
GONIN	Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale
MONNET	Bactériologie
BANSSILLON	Physiologie et pathologie obstétricales
CHATONNET	Physiologie B
GUINET	Clinique endocrinologie
TRILLAT	Clinique de chirurgie orthopédique
FREIDEL	Clinique stomatologique
MARION Joseph	Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles
DORCHE	Matière médicale et législation pharmaceutique
X.....	Histologie et embryologie

Professeurs à titre personnel

MM.

BERGER	Physique nucléaire appliquée à la médecine
BERTOYE	Bactériologie
CIER Jean-François	Physiologie
MANSUY	Chirurgie générale

Professeurs en surnombre :

MM.

SARBOUY	Pédiatrie et Puériculture
LACROIX	Climatologie
GOINARD	Thérapeutique chirurgicale
LIARAS	Propédeutique chirurgicale
COLLET	Chimie pharmaceutique

Professeurs sans chaire

MM.

ROMAN	Parasitologie
CIER André	Pharmacie chimique et Pharmacologie
PERROT	Chimie organique et toxicologie
DUMONT	Histologie et embryologie
FEROLDI	Anatomie pathologique
MORET	Physique biologique

Maîtres de Conférences Agrégés

MM.

LECUIRE	Neuro-chirurgie
REVOL Louis	Médecine générale
CREYSSSEL Roger	Chimie biologique
THIVOLET	Hygiène
GARIN	Parasitologie
TOLOT	Médecine du Travail
PINET	Electro-radiologie
DESPIERRES	Médecine générale
ODDOUX	Botanique et cryptogamie
de SOLLIER	Chimie analytique
LEJEUNE	Médecine générale et thérapeutique
REBOUILLAT	Chirurgie générale
BUFFARD	Electro-radiologie
NAUSSAC	Maladies infectieuses
ROMAGNY	Pédiatrie
de MOURGUES François	Stomatologie
DUROUX	Anatomie
BOUCHET	Anatomie
BRETTE	Thérapeutique
TOMMASI	Anatomie pathologique
RIFFAT	Hygiène
JOUVET	Pathologie expérimentale
FAVRE-GILLY	Hématologie
GIROD	Histologie et embryologie
MALLEIN	Chimie analytique
GRAS	Chimie biologique
PEYRIN	Physique biologique
VIALLIET-RAYNARD	Bactériologie
FAUCON	Biologie médicale et Pharmacodynamie
FLANDROIS	Physiologie

Agrégés en exercice

MM.

PONT	Médecine générale
VIGNON	Médecine générale
PLAUCHU	Médecine générale
TRAEGER	Médecine générale

MM.

DEVIC	Médecine générale
GARDE	Médecine générale
PERRIN André	Médecine générale
LARBRE	Médecine générale
MORNEX	Médecine générale
NORMAND	Médecine générale
FRIES	Médecine générale
LAMBERT	Médecine générale
NOEL Gilbert	Médecine générale
ROBERT	Médecine générale
MARION Pierre	Chirurgie générale
MICHAUD	Chirurgie générale
JAUBERT de BEAUJEU	Chirurgie générale
SAUTOT	Chirurgie générale
GUILLEMIN	Chirurgie générale
de MOURGUES Georges	Chirurgie générale
FRANCILLON	Chirurgie générale
SAUBIER	Chirurgie générale
MARET	Chirurgie générale
DESCOTES	Chirurgie générale
MICHOULIER	Chirurgie générale
BURTHIAULT	Obstétrique
DUMONT Martial	Obstétrique
GARMIER	Obstétrique
GIGNOUX	Oto-rhino-laryngologie
GAILLARD	Oto-rhino-laryngologie
FRANÇOIS	Pédiatrie et puériculture
BETHENOD	Pédiatrie et puériculture
COLOMB	Dermatologie
COLIN	Médecine légale
GUYOTAT	Neuro-Psychiatrie
SCHOTT	Neuro-Psychiatrie
BONAMOUR	Ophtalmologie
HUGONNIER	Ophtalmologie
DURAND	Urologie
CHASSARD	Electro-Radiologie
ALLEGRE	Neuro-chirurgie
FAYASSE	Orthopédie
SCHNEPP	Orthopédie
KALB	Pneumo-phtisiologie
DUMAS	Stomatologie

Examineurs de la Thèse

MM. Professeurs A. BADINAND , A. VACHON , J. DORCHE ,
agréé R. MALLEIN.

A LA MEMOIRE DE MES GRANDS-PARENTS

A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA FEMME

A MA MERE

bien modeste témoignage de mon affection et de ma
gratitude

A MES BEAUX-PARENTS

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur A. BADINAND

Professeur de Chimie Analytique Pharmaceutique
Pharmacien des Hôpitaux
Chevalier de la Légion d'Honneur

*

Nous avons pu bénéficier de son enseignement et de sa grande bienveillance au cours de notre premier semestre d'internat à l'Hôpital de l'Antiquaille et tout au long de ce travail où il nous a prodigué ses conseils et ses encouragements.

Nous le prions de croire à notre très respectueux et très fidèle attachement.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur A. VACHON

Professeur de Pathologie Médicale
Médecin des Hôpitaux

Il nous a fait le très grand honneur d'accepter de juger notre travail.

Nous le prions de bien vouloir trouver ici l'expression de notre très respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur J. DORCHE

Professeur de Matière Médicale et de Législation Pharmaceutique
Pharmacien des Hôpitaux

Durant un semestre d'internat passé dans son service hospitalier nous avons pu bénéficier de son enseignement et de ses hautes qualités humaines.

Nous sommes heureux de le compter parmi nos juges et nous l'assurons de notre très respectueux dévouement.

Monsieur le Professeur Agrégé R. MALLEIN

Professeur Agrégé de Chimie Analytique Pharmaceutique
Pharmacien des Hôpitaux

Il nous a fait le grand honneur de nous confier le sujet de ce travail et de nous guider tout au long de sa réalisation. Nous avons pu apprécier, pendant quatre semestres d'internat passés dans son service hospitalier, la richesse de son enseignement et nous le remercions de la sympathie qu'il nous a toujours témoignée.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre reconnaissance et de notre attachement.

A Monsieur A. REVOL

Assistant à la Faculté
Pharmacien des Hôpitaux.

*

Au cours de ce travail il nous a fait bénéficier de ses connaissances étendues et nous a amicalement prodigué son aide et ses encouragements.

Nous l'assurons de notre reconnaissance et de notre amitié.

A L'INTERNAT EN PHARMACIE DES HÔPITAUX DE LYON

I N T R O D U C T I O N

Depuis 1936, de nombreuses hormones ont été isolées de la corticosurrénale. Cependant la substance responsable de la grande activité minéralo-corticoïde de la fraction amorphe n'avait pu être mise en évidence par suite de la dissociation qui existe entre son action physiologique très intense et son faible taux de sécrétion (environ 200 microgrammes par 24 heures). On considérerait la désoxycorticostérone et la 17 hydroxy désoxycorticostérone comme les hormones responsables du métabolisme des électrolytes.

La découverte simultanée de l'aldostérone en 1953 par SIMPSON, TAIT, WETTSTEIN, NEHER, VON EUW et REICHSTEIN (144) et par MATTOX, MASON et ALBERT (101) a permis de définir l'hormone minéralocorticoïde physiologique.

En dehors des cas relativement rares d'hyperaldostéronisme primaire, l'aldostérone (et sa sécrétion) se trouve surtout impliquée dans un grand nombre d'affections en rapport avec un trouble du métabolisme des électrolytes. D'où les nombreuses recherches entreprises pour mettre au point une méthode de dosage précise et spécifique.

L'appréciation de la sécrétion des autres hormones corticosurrénaliennes est basée sur le dosage de leurs métabolites urinaires. Or on connaît mal les métabolites urinaires de l'aldostérone et on n'apprécie par les méthodes classiques de dosage que la fraction non métabolisée. L'utilisation récente de l'aldostérone marquée au tritium permet de mesurer la sécrétion au moyen de méthodes spécifiques et sensibles. Mais l'appareillage coûteux et les manipulations délicates restreignent leur emploi.

Nous avons essayé dans ce travail de définir une technique de dosage en tenant compte des deux impératifs suivants :

- l'aldostérone excrétée non métabolisée ne représente à l'état normal qu'une très faible fraction du taux de sécrétion.

La molécule d'aldostérone qui porte une fonction aldéhydique que l'on ne retrouve dans aucun autre stéroïde, ne possède pas de réaction spécifique de caractérisation et doit être séparée des autres corticostéroïdes de structure chimique voisine.

Avant d'aborder notre sujet il semble nécessaire de rappeler les connaissances actuelles sur la sécrétion et le rôle de l'aldostérone ainsi que sur les techniques proposées pour son dosage dans les milieux biologiques.

PLAN DU TRAVAIL

PREMIERE PARTIE

- I. Structure, propriétés physico-chimiques et synthèse de l'aldostérone.
 - Structure
 - Propriétés physico-chimiques
 - Synthèse
- II. Métabolisme, propriétés physiologiques de l'aldostérone.
 - Biosynthèse
 - Métabolisme
 - Régulation de la sécrétion
 - . Les mécanismes régulateurs
 - . Les commandes centrales de la sécrétion
 - Rôle biologique
 - Utilisation thérapeutique
- III. Participation de l'aldostérone à divers états pathologiques
- IV. Les inhibiteurs de l'aldostérone
 - Inhibition de la synthèse hormonale
 - Inhibition de l'action périphérique de l'aldostérone

DEUXIEME PARTIE

- I. Réaction de caractérisation de l'aldostérone
 - Réactions dues au groupement $\Delta 4-3$ -céto
 - Réactions dues à la fonction cétonique en 3
 - Réactions dues au groupement $\Delta 4-3$ -céto et à la chaîne latérale α cétolique
 - Réactions dues à la chaîne latérale α cétolique
 - Autres réactions

II. Les méthodes biologiques de dosage de l'aldostérone

III. Les méthodes physico-chimiques de dosage de l'aldostérone

- Hydrolyse, extraction
- Purification des extraits urinaires
- Séparation de l'aldostérone des autres stéroïdes.

. Systèmes proposés :

systèmes de Bush
 systèmes de Zaffaroni
 comparaison des systèmes de Bush et de Zaffaroni
 systèmes dérivés de ceux de Bush
 systèmes dérivés de ceux de Zaffaroni
 chromatographie en phases inversées
 autres systèmes

. Systèmes utilisés

. Conclusion

- Détermination quantitative

- . Par comparaison visuelle sur le chromatogramme
- . Par photométrie après élution

- Résultats

- . Causes d'erreur
- . Conclusion

IV - Les méthodes de dosage de l'aldostérone utilisant les corps marqués

- Technique par marquage de la molécule d'aldostérone
- Technique par marquage de l'acide estérifiant l'aldostérone
 - . Estérification par l'anhydride acétique
 - . Estérification par le pipsan
- Résultats

V - Conclusions

TROISIEME PARTIE - Techniques personnellement utilisées

I. Hydrolyse, extraction, purification

- Recueil des urines
- Hydrolyse, extraction
- Purification des extraits urinaires

- . chromatographie d'adsorption
- . partage entre solvants

II. Séparation de l'aldostérone

- Première chromatographie
- Deuxième chromatographie
 - . systèmes de type Bush :
 - systèmes "E2B"
 - systèmes de Di Perri coll.
 - . systèmes de type Zaffaroni :
 - systèmes de Mattox et Lewbart

III. Détermination quantitative

- La réaction au bleu de tétrazolium
 - . réactifs
 - . technique
 - . résultats
- La réaction à l'hydrazide salicylique
 - . réactifs
 - . technique proposée par Chen
 - réaction avec l'hydrazide salicylique
 - séparation de l'excès de réactif
 - élution de l'hydrazone
 - résultats obtenus : spectres des hydrazones de l'aldostérone et de l'hydrocortisone, courbe d'étalonnage
 - conclusions
 - . étude détaillée et modifications apportées à la réaction
 - étude de la séparation de l'excès de réactif par chromatographie sur papier et par partage entre solvant.
 - étude de l'élution des hydrazones :
 - étude du temps et du mode d'élution
 - technique proposée
 - résultats obtenus avec de l'aldostérone pure
 - . application à la détermination de l'aldostérone
 - . conclusions
- La réaction à l'hydrazide isonicotinique
 - . réactifs
 - . étude de la réaction avec de l'aldostérone pure
 - réaction avec l'hydrazide isonicotinique

- spectre d'absorption de l'hydrazone isonicotinique de l'aldostérone
- courbe d'étalonnage
- conclusions
- .. étude détaillée et modifications apportées à la réaction
 - cinétique de la réaction
 - influence de la concentration en INH
 - influence de la concentration en HCl
 - influence de la lumière
 - conclusions
- . application à la détermination de l'aldostéronurie
 - étude de la purification des papiers à chromatographie par lavage : lavage par les solvants de la deuxième chromatographie, par le chloroforme, par le méthanol. Technique proposée. Résultats.
 - étude de la purification des extraits de papier par la méthode d'Oertel et Eik-Nes : technique, résultats.
 - . conclusions
- Conclusion

QUATRIEME PARTIE

I. Discussion des techniques étudiées

- Extraction, purification et séparation de l'aldostérone
- Détermination quantitative
 - . dosage par caractérisation de la chaîne latérale α cétolique
 - . dosage par caractérisation du groupement Δ 4-3-céto.
- Etude des pertes en aldostérone au cours des différentes opérations

II. Résultats obtenus dans les dosages urinaires

- Etude statistique des résultats
- Chiffres pathologiques

III. Etude des causes d'erreurs dans la détermination de l'aldostéronurie

- Composés non identifiés sur les chromatogrammes

- Causes d'erreur

. chromogènes urinaires

. aldactone

réactions analytiques

comportement chromatographique

étude des extraits urinaires des malades

traités par l'aldactone

conclusions

IV. Méthode proposée

CONCLUSIONS

PREMIERE PARTIE



I - STRUCTURE - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES - SYNTHESE DE L'ALDOSTERONE

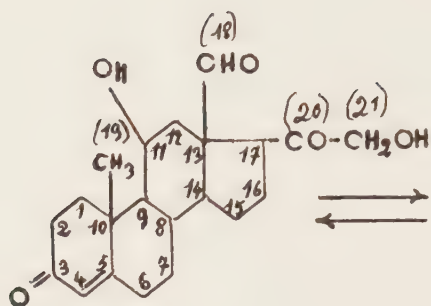
L'isolement de l'aldostérone cristallisée à partir des surrénales de boeuf et de porc par SIMPSON, TAIT, WETTSTEIN, NEHER, von EUW et REICHSTEIN en 1953 (144), par MATTOX, MASON et ALBERT (101) et à partir de l'urine d'un néphrotique par LUETSCHER, NEHER et WETTSTEIN (91), est le point de départ des travaux relatifs à l'élaboration de sa structure

A cette date, seules la fonction cétonique α β insaturée et la chaîne latérale α cétoïque sont mises en évidence. On ne possède encore aucune preuve du caractère stéroïdique (169).

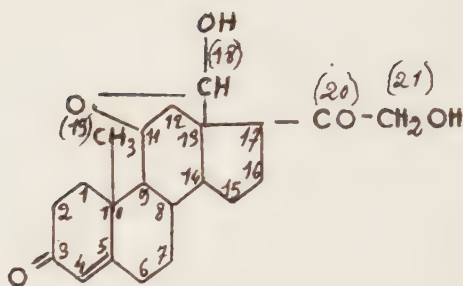
La même équipe de chercheurs Suisses établit en 1954 la structure et la configuration stérique (144) et la définit comme une 18-céto-corticostérone.

STRUCTURE

L'aldostérone (électrocortine, 11 β , 21-dihydroxy-3, 20-dicéto- Δ 4-prégnène-18-al) possède comme toutes les hormones cortico-surrénaliennes, le noyau de base perhydrocyclopentanophénanthrénique, mais s'en distingue essentiellement par une fonction aldéhydique portée par le carbone 13, fonction que l'on retrouve portée par le carbone 10 dans la strophantidine. Cette fonction aldéhydique peut être acétalisée par l'hydroxyle porté par le carbone 11 et les deux structures libre et héli-acétalique sont en équilibre dans l'organisme.



STRUCTURE ALDEHYDIQUE



STRUCTURE CYCLO-HEMIACETALIQUE

On retrouve dans la structure de l'aldostérone le groupement Δ^4 -3-céto, l'hydroxyle 11 β chimiquement relativement inerte mais d'une grande importance biologique, la chaîne latérale α -cétoïque en 17, communs à la plupart des stéroïdes corticosurrénaux, mais il n'y a pas d'hydroxyle en 17.

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

L'aldostérone peut être obtenue anhydre (Poids moléculaire 360,44) ou cristallisée avec une molécule d'eau.

Elle est soluble dans les solvants organiques polaires (éthanol, méthanol, chloroforme), très peu soluble dans les solvants organiques apolaires (benzène, toluène, éther de pétrole). C'est le corticostéroïde le plus soluble dans l'eau.

Cristallisée, elle possède un double point de fusion à 108° - 112° puis à 155° - 160° .

La forme naturelle de l'aldostérone est la forme d, la synthèse fournit la forme d et la forme racémique. Le pouvoir rotatoire spécifique déterminé dans l'acétone est:

$$[\alpha]_D^{23} = + 145^{\circ} \pm 2^{\circ} \quad (144-145)$$

La solution alcoolique d'aldostérone présente un spectre d'absorption dans l'ultra-violet, dû à la présence du groupement Δ 4-3-céto. On note un maximum à 239 m μ et un minimum à 225 m μ (121-145).

Le spectre infra-rouge, spécifique d'un composé défini, montre une bande étroite à 2,77 μ qui correspond à un hydroxyle libre, une bande large à 2,85-3,05 μ qui implique la présence d'un hydroxyle lié à un hydrogène et une bande étroite à 5,98 μ liée au groupement Δ 4-3-céto. (SIMPSON et coll.)

De nombreuses autres réactions (spectre d'absorption dans les acides, réactions du groupement Δ 4-3-céto, de la chaîne latérale α -cétolique) sont décrites pour les corticostéroïdes et pour l'aldostérone. En raison de leur utilisation dans la caractérisation et le dosage de l'aldostérone dans les milieux biologiques, leur étude sera envisagée dans le chapitre suivant.

L'aldostérone peut être décomposée par l'acide chlorhydrique en milieu méthanolique (144-145). Sous l'action d'agents oxydants tels que l'anhydride chromique elle se transforme en γ lactone et en formaldéhyde. La γ lactone est caractérisée par son spectre d'absorption dans l'infra rouge (145).

L'anhydride acétique conduit à la formation d'acétates d'aldostérone. En faisant agir de l'anhydride acétique sur une solution d'aldostérone dans la pyridine pendant quinze heures à 20° on obtient le diacétate en 18 et en 21 (145) de point de fusion 80°. On connaît également un monoacétate en 21 qui cristallise en aiguilles plates de point de fusion 198°-199°.

SYNTHESE

La première synthèse de l'aldostérone racémique fut réalisée en 1955 par SCHMIDLIN, ANNER, BILLETTER et WETTSTEIN (139). Celle-ci ne comporte pas moins de vingt étapes à partir d'un composé tricyclique, lui-même dérivant de l'acide propionique en dix étapes (169).

Les mêmes auteurs publient en 1956 la synthèse de la d aldostérone par voie chimique (169) alors que VISCHER, SCHMIDLIN et WETTSTEIN (165) mettent à profit l'hydroxylation en 21 par un micro-organisme, d'un intermédiaire

dans la synthèse de l'aldostérone racémique, en dérivé d'exclusivement. WIELAND et coll. décrivent en 1960 la synthèse de l'acétate de la d-l 17-hydroxyaldostérone(171).

La même année il faut noter deux publications importantes, ayant trait à un accès à l'aldostérone à partir de structures stéroïdiques naturelles par les chercheurs suisses HEUSLER et coll. (65) et par VELLUZ et coll. (162).

II - METABOLISME - PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES

DE L'ALDOSTERONE

Les hormones sécrétées par la cortico-surrénale peuvent être classées en trois groupes : les minéralocorticoïdes, les glucocorticoïdes et les androgènes. Les minéralocorticoïdes, dont l'aldostérone est l'hormone physiologique, ne représentent qu'une faible fraction quantitative, mais leur activité biologique est grande.

BIOSYNTHESE

La biosynthèse de l'aldostérone est localisée pour la plus grande part au niveau de la zone glomérulée de la corticosurrénale. Dès 1948 DEANE, SHAW et GREEP indiquent que les variations de la ration sodique et potassique entraînent des modifications histologiques au niveau de la zone glomérulée du cortex surrénalien (49). GIROUD et coll. (60), AYRES et coll. (4), apportent une preuve décisive en montrant que la zone glomérulée de la corticosurrénale du rat, en incubation in-vitro, sécrète de l'aldostérone et un peu de corticostérone; les zones fasciculée et réticulée ne sécrétant que de la corticostérone, du cortisol et des androgènes.

L'étude des précurseurs de l'aldostérone se réalise in vitro par incubation de broyats de glandes surrénales entières ou de parties de surrénales (zone glomérulée) avec des précurseurs présumés, le plus souvent marqués par le carbone 14 (3).

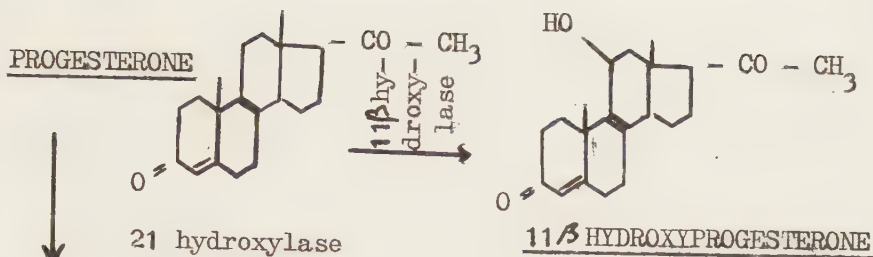
On peut retenir trois précurseurs possibles : la progestérone, la désoxycorticostérone et la corticostérone (le point de départ reste le cholestérol); mais les opinions des auteurs diffèrent quant à leur importance respective. Alors que TRAVIS et FARRELL (155) accordent une égale valeur à ces trois précurseurs, KAHNT, NEHER et WETTSTEIN (74) - AYRES et coll. (3) - GIROUD et coll. (178) soulignent le rôle important de la désoxycorticostérone

tandis que MULROW et COHN in vitro (110) et SELTZER et CLARK (142) in vivo montrent que la corticostérone peut conduire à l'aldostérone. ROSENBERG et coll. (133) admettent le rôle important de la progestérone sans que l'accès à l'aldostérone se fasse nécessairement par l'étape intermédiaire de la corticostérone.

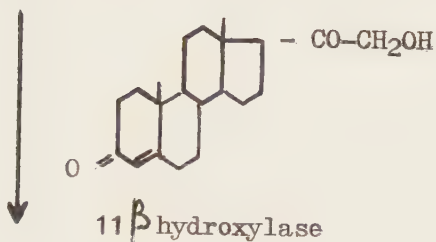
Un travail récent de AYRES et coll. (5) montre qu'in vitro la progestérone, la désoxycorticostérone et la corticostérone marquées sont toutes transformées en aldostérone par la zone glomérulée des capsules surrénales de bovidés (50 % de l'aldostérone au moins proviennent de la corticostérone). La progestérone semble être un précurseur majeur à la fois de l'aldostérone et de la corticostérone mais il ne faut pas exclure une biosynthèse secondaire ne passant pas par la progestérone.

L'isolement de la 18-hydroxy-désoxycorticostérone par WETTSTEIN a permis de confirmer l'hydroxylation en 18 de la désoxycorticostérone, tandis que l'isolement de l'hydroxylactone (18/20) par NEHER et WETTSTEIN (114) tend à prouver que la surrénale oxyde la fonction alcoolique en 18 jusqu'à une fonction acide, d'où un stade aldéhydique intermédiaire. Cette attaque des méthyl angulaires semble être une voie métabolique classique dans la série stéroïde.

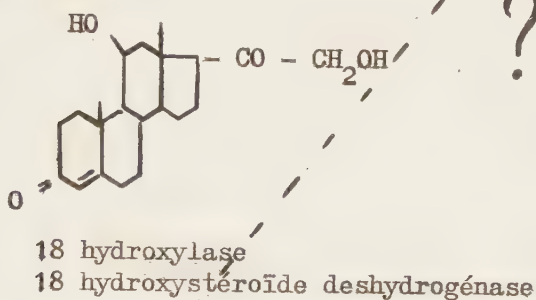
Concluons avec GRANT (62) qu'il existe encore beaucoup d'incertitudes sur cette biosynthèse; on ne sait pas à quel stade se fait l'hydroxylation en 18. Nous empruntons à cet auteur le schéma suivant :



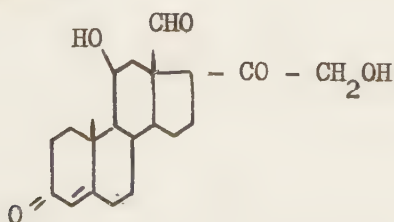
11 DESOXYCORTICOSTERONE



CORTICOSTERONE



ALDOSTERONE



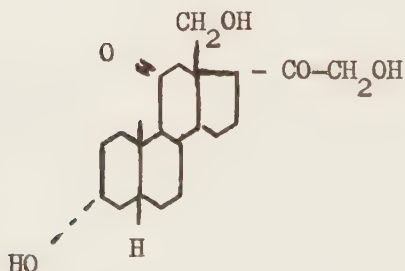
Toutes ces réactions sont conditionnées par les systèmes enzymatiques de la glande surrénale, mais contrairement aux autres corticostéroïdes le contrôle de la biosynthèse échappe en grande partie à l'ACTH (178), tandis que les recherches de FARRELL (55) et de NEWMANN, REDGATE et FARRELL (120) mettent en évidence le rôle primordial du diencéphale. Nous l'envisagerons dans la régulation de la sécrétion de l'aldostérone.

METABOLISME

L'étude du métabolisme de l'aldostérone a été rendue possible par l'utilisation de l'aldostérone marquée au tritium (57-108-158-178).

La sécrétion journalière se chiffre environ à 200 microgrammes. Déversée dans la circulation par la veine surrénale l'aldostérone (taux plasmatique : 0,8 à 1 microgramme par litre) se lie faiblement aux protéines plasmatiques, principalement à l'albumine (46). Elle disparaît rapidement du sang et subit des inactivations enzymatiques probablement au niveau hépatique (35-129) et des phénomènes de conjugaison.

On ne connaît actuellement qu'un seul métabolite urinaire de l'aldostérone. Isolé par ULICK et coll. (158) ce corps serait glycuconjugué, dépourvu d'activité physiologique et répondrait à la formule suivante :



5 β (?)—prégnane-3 α (?), 18,21 triol-11,20-dione

L'excrétion journalière serait environ quatre fois supérieure à celle de l'aldostérone provenant de l'hydrolyse du 3-cétoconjugué. ALBEAUX-FERNET, ROMANI et coll. (cités dans 182) ont montré que l'incubation d'aldostérone synthétique, avec des broyats de foie de rat conduit à trois formes plus polaires : tétrahydro, allotétrahydro-aldostérone et une forme α β cétone insaturée. Les formes tétrahydro peuvent être glycuco-conjuguées in vitro par les extraits hépatiques. Il faut noter également les travaux de BROOKS, MILLS et PRUNTY qui ont mis en évidence dans l'urine un corps (possédant un groupement Δ 4-3-céto) qui serait un métabolite de l'aldostérone ou d'un autre stéroïde ayant trait au métabolisme minéral (20).

En fait on ne peut actuellement mesurer d'une manière spécifique les métabolites urinaires de l'aldostérone et on est obligé d'apprécier le taux d'aldostérone urinaire non métabolisé.

L'aldostérone non métabolisée se trouve en majeure partie sous la forme 3-céto-conjuguée, hydrolysable uniquement par l'acide chlorhydrique à pH 1, en faible quantité sous forme libre extractible à pH neutre et sous une forme dépourvue d'activité physiologique libérable par la β glucuronidase.

REGULATION DE LA SECRETION

Il est nécessaire de distinguer d'une part les facteurs qui jouent le rôle de mécanisme régulateur et d'autre part les commandes centrales de la sécrétion d'aldostérone.

Les mécanismes régulateurs

Les propriétés électrolytiques de l'aldostérone (rétention sodique) firent porter les recherches sur le rôle du sodium sur la sécrétion.

En 1954 LUETSCHER et AXELROD (89) notent l'influence du taux de la ration sodique sur l'aldostéronurie. FALBRIARD, MULLER, NEHER et MACH (54) concluent ainsi à une étude sur les variations de l'aldostéronurie : "la sécrétion de l'aldostérone semble être un important mécanisme d'adaptation et de conservation de sel et d'eau". Le rôle du potassium est très modéré, cependant on a pu noter une augmentation de la sécrétion d'aldostérone lors de surcharges en potassium et inversement une diminution de la

sécrétion lors d'une restriction dans l'apport potassique.

Mais la variation de la ration sodique n'apparaît importante qu'en fonction de la variation de volume intravasculaire qu'elle entraîne (178). C'est à BARTTER que revient le mérite d'avoir montré le rôle fondamental du volume intravasculaire comme principal mécanisme régulateur de la sécrétion d'aldostérone (9). Une diminution du volume intravasculaire augmente la sécrétion, une augmentation du volume intravasculaire diminue la sécrétion. La découverte des zones volosensibles au niveau de l'oreillette droite (ANDERSON cité dans 56) et au niveau du carrefour carotido-thyroïdien (BARTTER et coll. 10) permet de comprendre comment se fait la transmission de la variation de volume aux commandes centrales de la sécrétion.

Les commandes centrales de la sécrétion

La sécrétion d'aldostérone dépend pour une part de l'ACTH, suivant le schéma connu pour le cortisol. Le diencephale par l'intermédiaire du CRF (Corticotrophin releasing factor) contrôle la sécrétion d'ACTH qui commande à son tour la biosynthèse et la sécrétion du cortisol et, très secondairement, de l'aldostérone (184). Mais l'importance du rôle de l'ACTH (10-48-109) et son mécanisme d'action (56) sont sujets à discussion.

L'importance de la région diencephalique comme centre de contrôle de la sécrétion d'aldostérone entrevue par RAUSCHKOLB et FARRELL (131), a été confirmée par les travaux de FARRELL et coll. (55-120) qui font état des variations de la sécrétion d'aldostérone au cours de l'atteinte traumatique du diencephale et qui caractérisent deux principes neurohormonaux actifs sur la sécrétion : l'adrénoglomérulotrophine (AGT) et le facteur X.

La commande de la sécrétion se trouve localisée au niveau mésencéphalique. Indépendamment de la sécrétion hypophysaire, le contrôle s'exerce par l'intermédiaire de l'AGT qui augmente la sécrétion d'aldostérone et par l'intermédiaire du facteur X qui inhibe la sécrétion (184).

Cependant DAVIS et coll. (48), étudiant un hyperaldostéronisme expérimental chez le chien, accordent plus d'importance au contrôle hypophysaire que mésencéphalique de la sécrétion d'aldostérone.

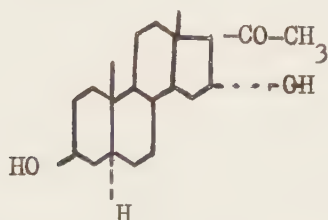
Enfin il faut noter l'observation intéressante de GENEST et coll. (16) : l'excrétion de l'aldostérone est

augmentée sous l'influence d'une perfusion d'angiotensine synthétique (identique à l'angiotensine obtenue par action de la rénine sur l'hypertensinogène plasmatique), chez le sujet normal et chez l'hypertendu. Cette augmentation de sécrétion s'accompagne d'une diminution de la filtration glomérulaire et d'une rétention sodique.

La connaissance du contrôle physiologique de l'aldostérone est encore bien imparfaite et d'autres recherches s'avèrent nécessaires.

ROLE BIOLOGIQUE

L'aldostérone, hormone minéralocorticoïde physiologique tient sous sa dépendance le métabolisme du sodium en relation avec l'hormone anti-diurétique et peut-être avec le "Sodium Excreting Factor" (SEF) découvert récemment par WETTSTEIN. Cependant il n'existe aucune preuve de cette dernière relation.



3 β , 16 α -dihydroxy-5 α -prégnane-20-one

Son action s'exerce au niveau du tube distal du néphron (8-138) où elle augmente la réabsorption des ions Na^+ en échange des ions K^+ , ce qui détermine une diminution du rapport Na^+ / K^+ dans l'urine. Au niveau du tube collecteur elle augmente la réabsorption des ions Na^+ en échange des ions NH_4^+ (HILGER, KLUMPER et ULRICH cités dans 183).

L'échange des ions K^+ intracellulaires contre des ions Na^+ et H^+ se fait aussi au niveau d'autres cellules de l'organisme (183). Dans la salive on note une diminution du rapport Na^+/K^+ .

Quant à l'excrétion du potassium, il faut bien noter qu'elle est plus consécutive à l'augmentation de la réabsorption du sodium qu'à l'action propre de l'aldostérone. (137)

Il ressort des études comparatives faites chez l'animal surrénalectomisé (92-138 152-178) et chez l'addisonien (96) que l'aldostérone possède une action qualitativement et quantitativement différente des autres minéralocorticoïdes (désoxycorticostérone, 17-hydroxycorticostérone). A doses physiologiques elle est 20 à 25 fois plus active que la désoxycorticostérone (100 microgrammes d'aldostérone suffisent pour maintenir une balance électrolytique convenable chez l'addisonien) et elle ne provoque pas de rétention pathologique d'eau. En outre elle n'a pas de propriétés néoglycogénétique, pas de propriétés anti-inflammatoires et son action sur l'éosinophilie est faible. A fortes doses on ne note pas de rétention hydrique.

L'aldostérone serait peut-être impliquée dans le métabolisme du magnésium. Elle possède une action protectrice vis-à-vis des chocs provoqués par les endotoxines(15). Elle n'a pas de propriétés progestatives (42). Selon ROSS (137) elle potentialise l'activité hypertensive de la noradrénaline quand on injecte ces deux substances simultanément.

Citons en conclusion les travaux de THORN et coll. (cités dans 137) : dans des conditions normales de ration sodique, potassique et aqueuse l'aldostérone ne semble jouer qu'un rôle minime dans la réabsorption du sodium. Il faut des conditions pathologiques pour que son action s'exerce : dans les syndrômes de déshydratation il y a une augmentation de la sécrétion d'aldostérone.

UTILISATION THERAPEUTIQUE

La synthèse en 1955 de l'aldostérone racémique a permis son emploi en thérapeutique dans la maladie d'Addison. La forme racémique est moins active que la forme naturelle d, mais celle-ci vient d'être synthétisée.

Les doses d'utilisation doivent être assez élevées (deux cent à trois cent microgrammes par 24 heures) par suite de son action fugace et de son élimination rapide (ROMANI cité dans 182). Il est préférable de l'administrer par voie parentérale (intramusculaire ou intraveineuse) que par voie buccale. En effet sa faible liaison avec les protéines sanguines ne la protège pas des dégradations au niveau du foie (AYRES et coll. dans 178).

On doit l'associer avec un corticostéroïde à propriétés hyperglycémiantes, telle la cortisone. Le traitement est surveillé par la mesure du rapport Na^+/K^+ dans l'urine et par la détermination du bilan azoté (180).

En dehors de la maladie d'Addison l'aldostérone peut être utilisée dans les états de chocs comme complément du traitement de routine.

L'aldostérone (*) est présentée en solution aqueuse de dl-aldostérone à cinq cent milligrammes par centimètre cube et en solution huileuse de l'acétate en 21 de la dl-aldostérone à cinq cent milligrammes par centimètre cube.

(*) spécialisée sous le nom d'Aldocortène par le Laboratoire CIBA.

III PARTICIPATION DE L'ALDOSTERONE A DIVERS ETATS PATHOLOGIQUES

Les variations du taux de sécrétion de l'aldostérone ne sont pas liées uniquement à des causes pathologiques. Il existe des variations physiologiques. C'est ainsi que le sujet au repos ou couché a une sécrétion inférieure à celle du sujet actif ou debout. Cette constatation a donné lieu à la mise en application d'un test d'orthostatisme (183). Il peut exister une augmentation physiologique de la sécrétion au cours de la grossesse.

Les hyperaldostéronismes pathologiques peuvent être classés en :

- hyperaldostéronisme primaire par atteinte de la sécrétion d'aldostérone.
- hyperaldostéronisme secondaire à différentes affections.

La première observation d'un hyperaldostéronisme primaire fut donnée par COHN en 1954 (39-40). Le syndrome de COHN, dû le plus souvent à un adénome surrénalien, se manifeste par de l'hypertension artérielle, des épisodes de faiblesse musculaire et de la polyurie. Biologiquement l'augmentation de l'aldostéronurie s'accompagne d'alcalose, d'hypokaliémie et d'une discrète élévation de la natriémie.

Une autre forme d'hyperaldostéronisme primaire est le syndrome de MACH (94). On note des oedèmes généralisés avec rétention sodique, mais il n'y a pas d'adénome.

L'hyperaldostéronisme secondaire est plus difficile à étudier, car il est consécutif à divers types d'affections : insuffisance cardiaque, hépatique ou rénale. GUINET (63) le définit ainsi : "Mode particulier de la réponse surrénalienne à différentes situations pathologiques mettant en cause un déséquilibre des électrolytes."

L'étude du rôle de l'aldostérone au cours des états oedémateux a fait l'objet de nombreux travaux. VESIN, JACQUIER, BAULIEU et CATTAN admettent que l'oedème se constitue par un transfert des électrolytes de l'espace intravasculaire dans les espaces interstitiels (164), la dimi-

nution du volume intravasculaire entraînant une augmentation de la sécrétion d'aldostérone et de l'hormone antidiurétique. Il se produit un retour à la normale du volume intravasculaire, suivi d'un nouveau passage dans les espaces interstitiels et la sécrétion d'aldostérone se trouve ainsi maintenue. ROMANI (135) introduit la notion de volume plasmatique efficace et pense (136) qu'il se produit un déséquilibre au niveau des vaso-récepteurs et peut-être une hypoxie des centres nerveux régulateurs. TRUNIGER (156) représente cet hyperaldostéronisme comme un mécanisme de compensation rénale des pertes extrarénales d'eau et de sodium dans les espaces interstitiels.

Les auteurs sont d'accord pour affirmer que l'oedème s'installe d'abord et que l'augmentation de la sécrétion d'aldostérone ne fait que l'entretenir (135-136-156 164-181).

Dans les cirrhoses hépatiques, on note également des rétentions aqueuses et sodiques, avec une aldostéronurie variable. CHART et coll. en 1953 trouvèrent une teneur en "Sodium Retaining Factor" de 3162 microgrammes en équivalents de désoxycorticostérone, dans l'urine d'un cirrhotique. WOLFF et KOCZOREK (172) d'une part, DYRENFURTH et coll. (50) d'autre part, retrouvent une hyperaldostéronurie variable mais surtout élevée dans les cirrhoses avec ascite. Mais comme le soulignent MALLEIN, BESSET, OLIVIER et VACHON après une étude de l'aldostéronurie chez des cirrhotiques ascitiques et oedémateux, il faut être prudent dans l'interprétation des résultats et ne pas voir nécessairement dans l'aldostéronurie le reflet de la sécrétion d'aldostérone (98).

Un hyperaldostéronisme a également été retrouvé dans les néphroses. LUETSCHER, NEHER et WETTSTEIN ont pu isoler à l'état cristallisé trois milligrammes d'aldostérone dans les urines de treize jours d'un néphrotique (91).

Après une intervention chirurgicale, qui crée une modification électrolytique sanguine, LLAURADO, NEHER et WETTSTEIN ont trouvé une hyperaldostéronurie. Ils ont appelé ce phénomène "transient aldosteronium".

A côté d'une hypersécrétion, peut exister un hypoaldostéronisme, au cours de la maladie d'Addison ou à la suite d'une surrenalectomie (182). Les travaux de HUDSON et coll., de SKANSE et coll. (cités dans 182) montrent qu'il peut exister des cas d'insuffisance de sécrétion

par altération de la synthèse hormonale.

L'appréciation d'une variation dans la sécrétion d'aldostérone (en pratique courante la détermination de l'aldostéronurie) au cours des divers états pathologiques envisagés, doit se faire d'une manière répétée et dynamique (69). On utilise des épreuves de surcharge ou de privation sodique, qui entraînent des variations de volume intravasculaire (183). La variation de la sécrétion d'aldostérone au cours de ces tests permettra de différencier le sujet normal et les hyperaldostéronismes primaires des hyperaldostéronismes secondaires.

IV - LES INHIBITEURS DE L'ALDOSTERONE

Le rôle aggravant de l'aldostérone dans les états œdémateux a été le point de départ de recherches pour l'obtention de substances inhibitrices de l'aldostérone.

VESIN, JACQUIER, BAULIEU et CATTAN (164) avaient essayé la Δ cortisone chez des cirrhotiques porteurs d'œdèmes. Ils avaient constaté une diminution de la sécrétion d'aldostérone et formulé une hypothèse d'action : la cortisone rétablirait le volume sanguin à partir des liquides interstitiels. La Δ cortisone augmente la filtration glomérulaire, mais n'agit pas comme anti-aldostérone.

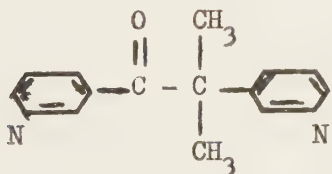
Les substances inhibitrices sont classées en deux groupes :

- celles qui inhibent la synthèse hormonale
- celles qui inhibent l'action périphérique (surtout rénale) de l'aldostérone.

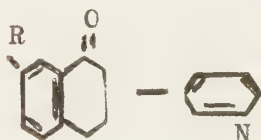
INHIBITION DE LA SYNTHÈSE HORMONALE

L'amphénone inhibe la sécrétion d'aldostérone mais également toute la sécrétion surrénalienne (95). Cette action globale à laquelle s'ajoutent des effets secondaires (nausées, vomissements) restreint son emploi en thérapeutique.

Cependant récemment KAHNT et NEHER (75) ont montré in vivo et in vitro que la biosynthèse de l'aldostérone était beaucoup plus sensible à la Métopirone S U 4885 (groupe de l'amphénone) et à d'autres corps (S U 9055 et S U 10603) que les autres corticostéroïdes.



METOPIRONE



S U 9055 R = H

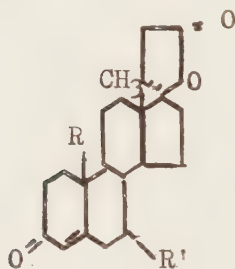
S U 10603 R = Cl

Comme pour les autres corticoïdes le blocage se fait au niveau de l'hydroxylation en 11 β et de l'hydroxylation en 18 et en 19, mais il s'y ajoute un phénomène de blocage supplémentaire. Peut-être est-ce là la voie vers une inhibition spécifique de la biosynthèse de tel ou tel stéroïde.

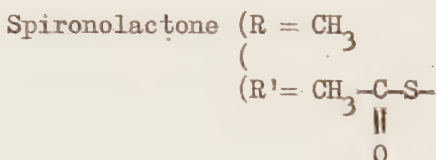
INHIBITION DE L'ACTION PERIPHERIQUE DE L'ALDOSTERONE

La synthèse par CELLA (33) de composés stéroïdes nouveaux : les Spirolactones, l'étude de leur action par KAGAWA (72) et par LIDDLE (88) chez le rat surrénalectomisé ont permis l'utilisation en thérapeutique d'inhibiteurs de l'action périphérique de l'aldostérone. Ces corps présentent une identité structurale avec l'aldostérone.

La structure de base des Spirolactones est :



4-androstène-3-one-17-spirolactone



Un premier dérivé le S C 8109 a été étudié par SLATER, MOSCHAM, MURTER et NABARRO (147) : les résultats obtenus sont variables. CELLA et coll. (31-32) ont synthétisé un composé actif par voie buccale, la spironolactone. Cette spirolactone est substituée en R par un groupement méthyle et en R' par un groupement thioacétylé. KAGAWA (72), FUCHS, MOYER et NEXMAN (58) montrent que ce corps s'oppose à la rétention sodique, accroît la diurèse en modifiant peu l'excrétion du potassium. Il ne possède pas d'action androgène, ni anabolisante, oestrogène ou progestative (72). La spironolactone ne semble agir que dans les cas d'hyperaldostéronisme. Son mode d'action mal connu, peut être attribué à une inhibition compétitive de l'action de l'aldostérone sur la réabsorption du sodium au niveau du tube rénal (58).

La spironolactone (*) est utilisée aux doses de 400 à 600 milligrammes par 24 heures. On ne note pas d'intolérance. Utilisable dans tous les cas d'oedèmes, il semble que son action soit particulièrement intéressante dans les cirrhoses (58-186).

(*) Spécialisée sous le nom d'ALDACTONE par les Laboratoires BYLA.

DEUXIEME PARTIE

I - REACTIONS DE CARACTERISATION DE L'ALDOSTERONE

Le problème de la caractérisation de l'aldostérone est identique à celui des autres corticostéroïdes à 21 atomes de carbone (7). En effet la présence d'un groupement aldéhydique en 18, unique parmi les corticostéroïdes, n'a pas donné lieu à la description d'une réaction spécifique de caractérisation. Entre autres les travaux de EXLEY et coll. (53) montrent que l'aldostérone ne peut donner la réaction d'ANGELI-RIMINI spécifique du groupement aldéhydique, probablement par suite de l'acétalisation du groupement aldéhydique en 18.

Les constantes physico-chimiques (point de fusion, pouvoir rotatoire, spectre infra-rouge) s'avèrent surtout intéressantes pour l'identification. Mais l'aldostérone isolée des milieux biologiques n'est jamais suffisamment purifiée, ni obtenue en quantités assez importantes pour permettre leur emploi. C'est pourquoi l'aldostérone sera caractérisée par des réactions de groupe que nous allons étudier.

REACTIONS DUES AU GROUPEMENT Δ 4-3-CETO

Les doubles liaisons conjuguées du groupement Δ 4-3-céto sont responsables des spectres d'absorption en lumière ultra-violettes donnés par les stéroïdes en solution alcoolique. L'aldostérone possède un maximum d'absorption à 239 m μ et un minimum à 225 m μ (121-144). Sur les chromatogrammes les Δ 4-3-cétostéroïdes absorbent fortement la lumière ultra-violettes quand on les expose à une source lumineuse qui rayonne principalement à 253,7 m μ .

Les Δ 4-3-cétostéroïdes traités par un alcalin (soude caustique) et irradiés par la lumière ultra-violettes développent une fluorescence jaune (BUSH 25). Cette réaction peut être utilisée sur le chromatogramme ou sur le stéroïde en solution.

Le carbonyl du groupement Δ 4-3-céto est capable de conduire à la formation d'hydrazones :

- avec l'hydrazide isonicotinique, en milieu acide,

on obtient une hydrazone jaune, fluorescente en lumière ultra-violette. Le spectre d'absorption de cette hydrazone présente un maximum à $380\text{ m}\mu$. Les céstostéroïdes saturés ou possédant une double liaison ailleurs qu'en $\alpha\beta$ ne donnent pas la réaction (UMBERGER 159). Cette réaction a été appliquée à la différenciation (148) et au dosage des $\Delta 4$ et $\Delta 1,4\text{-}3$ -céstostéroïdes (37).

- avec l'hydrazide salicylique, réactif préconisé par CAMBER (27) et utilisé par CHEN (36) pour le dosage de l'aldostérone on obtient une hydrazone dont le spectre montre un maximum à $295\text{ m}\mu$, un petit pic à $308\text{ m}\mu$ et un minimum à $260\text{ m}\mu$. Examinée en lumière de Wood, cette hydrazone donne une fluorescence jaune (29). CAMBER a proposé de condenser les hydrazones avec la p-aminodiéthylaniline stabilisée, ce qui conduit à la formation d'indanolines bleues vertes (28).

Le groupement $\Delta 4\text{-}3$ -céto est également responsable d'une réaction positive avec le nitroprussiate de sodium. Cette réaction a été appliquée par LAUBIE (82) au dosage de la progestérone et de la désoxycorticostérone.

REACTIONS DUES A LA FONCTION CETONIQUE EN 3

Avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine les groupements cétoniques en 3, 6, 7, 12, 16, 17 et 20 réagissent rapidement; seul le groupement en 11 fait exception (7). GORNALL et MACDONALD montrent que les $\Delta 4\text{-}3$ -céstostéroïdes réagissent en 5 minutes à 20° (61). REICH, KRANE et SANFILIPPO ont caractérisé les hydrazones de quelques stéroïdes par leur point de fusion, leur comportement chromatographique et leur spectre dans l'ultra-violet et l'infrarouge (132). MOOLENAR utilise ce réactif pour le dosage de l'aldostérone (105-106).

La condensation de cétones stéroïdes avec le 2,6-di-terbutyl p crésol, en milieu alcalin, conduit à un produit chromogène de coloration variable suivant la nature du groupement cétonique (SCHULZ et NEUSS 140). BARTOS a montré que la condensation se réalise avec le composé phénolique à l'état oxydé. Il améliore la réaction en ajoutant de l'eau oxygénée qui s'avère le meilleur oxydant. Les $\Delta 4\text{-}3$ -céstostéroïdes donnent une coloration bleue avec un maximum d'absorption à $610\text{ m}\mu$; la coloration est rose pour les 3-céstostéroïdes saturés, jaune orangé pour les 3-céstostéroïdes non saturés et portant un carbonyle en 11.

BARTOS indique également l'emploi comme réactif phénolique de l'alcool 3,5-diterbutyl-4-hydroxybenzylique (11).

REACTIONS DUES AU GROUPEMENT Δ 4-3-CETO ET A LA CHAÎNE LATÉRALE α CETOLIQUE

Le réactif arséno-molybdique est réduit en bleu de molybdène (141).

REACTIONS DUES A LA CHAÎNE LATÉRALE α CETOLIQUE

La chaîne latérale α céto-lique possède des propriétés réductrices vis-à-vis d'un grand nombre de réactifs : nitrate d'argent, permanganate de potassium, réactif molybdo-acéto sulfurique.

Mais la réduction des sels de tétrazolum en formazans est la plus employée.

Les sels de tétrazolum utilisés sont :

- le chlorure de 3,3'-dianisole-4,4'-bis (3-5 diphenyl) tétrazolum ou bleu de tétrazolum qui par réduction en milieu alcalin conduit à un formazan de coloration bleue (37-99-119). Cette réaction a été étudiée en fonction de différents facteurs : concentration du réactif, pH et température. Par rapport aux autres sels, il semble que ce soit celui qui présente la meilleure sensibilité (99). De plus la coloration obtenue est stable plusieurs mois à l'obscurité.

- le chlorure de 2,3,5-triphenyl-tétrazolum est réduit en un formazan de coloration rouge instable (97-99).

- le chlorure de 2(p-iodophenyl)-3(p-nitrophényl)-5-phényltétrazolum et le tolyldiphenyltétrazolum (119).

WEISZ et coll. (168) ont proposé l'utilisation de sels de tétrazolum marqués par le carbone 14. La sensibilité de la méthode est augmentée et l'application aux liquides biologiques est en cours d'essai.

Les stéroïdes porteurs d'une chaîne latérale α céto-lique ne donnent pas la réaction de PORTER et SILBER. Seuls les stéroïdes porteurs d'une chaîne latérale 17,21-dihydroxy-20-cétone ou d'une chaîne latérale glyoxalique donnent la réaction. LEWBART et MATTOX ont réalisé l'oxydation de la chaîne α céto-lique en chaîne glyoxalique par l'acétate de cuivre (86). Ceci permet de doser l'aldostérone par la réaction de PORTER et SILBER.

AUTRES REACTIONS

Les stéroïdes réagissent avec les acides pour donner des chromogènes. Ces réactions dépendent de la structure moléculaire du corps envisagé et les spectres d'absorption des chromogènes obtenus sont souvent plus spécifiques que les spectres d'absorption obtenus en solution alcoolique. KALANT (77) a étudié, en fonction de plusieurs facteurs, les chromogènes formés par les stéroïdes dans les acides.

SIMPSON et coll. (145) donnent les spectres de l'aldostérone en fonction du temps et de la température. En milieu sulfurique, après repos de 2 heures à une température de 20°, l'aldostérone possède un maximum à 288 m μ ; après chauffage à 90°, pendant une heure, on obtient 4 maxima : 247, 285, 342 et 460 m μ . En milieu phosphorique (acide phosphorique à 85 % + pentoxyde de phosphore) après chauffage à 107° pendant 20 minutes, il n'y a qu'un maximum à 280 m μ .

Ces réactions s'accompagnent souvent de fluorescence. KALANT (75), BRUINELS et VAN NOORDWIJK (22) proposent une méthode de dosage de l'aldostérone basée sur le développement d'une fluorescence dans l'acide sulfurique.

La diphenylamine en milieu acéto-sulfurique donne une coloration bleue avec l'aldostérone (CLARK 38). Le spectre du composé obtenu présente un maximum à 640 m μ , un pic à 530 m μ et une valeur négative à 450 m μ .

L'oxydation périodique de l'aldostérone conduit à une lactone. LEGRAND, PASQUALINI et JAYLE (85) font réagir sur cette lactone l'hydroxylamine (réaction de FEIGL), puis sur l'acide hydroxamique formé un sel ferrique. Le complexe coloré obtenu peut servir au dosage de l'aldostérone et de tous les stéroïdes capables de donner des lactones par oxydation. N'appartiennent à ce groupe que les stéroïdes oxygénés en 18 et possédant un groupement alcool en 21. L'aldostérone et ses métabolites constituent les seuls stéroïdes urinaires physiologiques capables de donner cette réaction. La sensibilité de la méthode (5 microgrammes ou moins) paraît par contre insuffisante pour évaluer les aldostéronuries normales. Les auteurs décrivent une première application au dosage de l'aldostérone ajoutée à des extraits urinaires.

Les réactions que nous venons d'étudier sont des réactions de groupe, donc des réactions non spécifiques. Elles doivent être appliquées après isolement de l'aldostérone des milieux biologiques. C'est ce que nous allons envisager maintenant.

II - LES METHODES BIOLOGIQUES DE DOSAGE DE L'ALDOSTERONE

Les méthodes biologiques de dosage de l'aldostérone dans l'urine nécessitent des extraits urinaires suffisamment purifiés pour obtenir des résultats corrects. Ces techniques de purification qui font le plus souvent appel à la chromatographie d'adsorption sur colonne seront exposées dans le chapitre suivant.

Les méthodes biologiques sont basées sur les propriétés de l'aldostérone concernant le métabolisme du sodium et du potassium : chez le rat surrénalectomisé, l'aldostérone détermine une diminution du rapport Na^+/K^+ dans l'urine.

SIMPSON et TAIT (143) ont déterminé la valeur de ce rapport à l'aide d'ions Na^+ et K^+ marqués, au cours des premières études sur les hormones électrolytiques en 1952. AXELRAD et coll. (2), JOHNSON (70) LLaurado (89) utilisent la même méthode. SINGER (146) détermine uniquement le taux de 24 Na.

Le meilleur paramètre de réponse semble être actuellement le logarithme du rapport 24 Na sur 42 K (153).

Mais ces méthodes sont longues et nécessitent un grand nombre d'animaux pour conduire à des résultats variables. On leur préférera pour les analyses de routine, les techniques physico-chimiques.

III . LES METHODES PHYSICO-CHIMIQUES DE DOSAGE DE L'ALDOSTERONE

Les méthodes physico-chimiques proposées par les auteurs sont applicables presque exclusivement à l'urine. Elles suivent toutes le même protocole opératoire : hydrolyse de l'aldostérone conjuguée et extraction, purification des extraits urinaires, séparation chromatographique et estimation physico-chimique.

HYDROLYSE-EXTRACTION

L'aldostérone dosée dans l'urine par les techniques habituelles représente uniquement l'aldostérone excrétée non métabolisée en majeure partie sous la forme d'un 3-céto-conjugué (l'aldostérone excrétée non métabolisée sous forme libre ne représente qu'une faible partie, 5 % environ) (68).

L'étude des divers modes d'hydrolyse du 3-céto-conjugué a permis de montrer que l'hydrolyse en milieu acide (acide chlorhydrique à pH I est la plus satisfaisante (2, 12, 21, 105, 122, 124, 149, 163).

NOWACZINSKI et coll. la complètent par une incubation à pH 4,5 avec de la glucuronidase. DI PERRI et coll. préconisent l'hydrolyse acide à la chaleur (47). Mais à pH 4,8 ou 6 ou en milieu alcalin l'hydrolyse est très incomplète (2-89).

Une publication récente d'UNDERWOOD et coll. (160) a fait le point sur les différentes techniques d'hydrolyse acide : quelque soit le protocole opératoire suivi (urines amenées à pH I et laissées 24 ou 48 heures à la température du laboratoire avec ou sans solvant d'extraction ou bien urines amenées à pH I et soumises immédiatement à l'extraction) les résultats diffèrent très peu.

L'extraction est faite par le chloroforme ou le dichlorométhane pendant 24 ou 48 heures. Mais certains auteurs prétendent qu'une extraction brève est suffisante (19). L'urine pourra être préalablement saturée de chlo-

rure de sodium pour éviter les émulsions (112). NOWACZINSKI et GENEST (118) ont utilisé une dialyse pour l'extraction de l'aldostérone, de la cortisone et de l'hydrocortisone du plasma. Cette méthode préconisée par ZAFFARONI est légèrement modifiée et se pratique contre du chloroforme pendant 72 heures.

PURIFICATION DES EXTRAITS URINAIRES

L'extraction préalable de l'urine à pH neutre élimine la majeure partie de la cortisone, de l'hydrocortisone et des impuretés; sans diminuer d'une manière significative le taux d'aldostérone (nous avons dit plus haut que l'aldostérone extraite à pH neutre représente 5 % de l'aldostérone non métabolisée) (153).

Une purification est réalisée par des lavages avec des solutions alcalines : Soude 0,1 N ou Carbonate disodique 0,05 N. Il est préférable d'utiliser une solution de carbonate disodique, car l'emploi de la soude sans contrôle rigoureux de la température peut conduire à des pertes importantes d'aldostérone (GARST et coll. 59). La plupart des auteurs recommandent de pratiquer une extraction de la fraction d'aldostérone qui aurait pu passer dans les liquides de lavage.

Le partage entre un solvant polaire et un solvant non polaire permet de séparer l'aldostérone (qui reste dans la phase polaire), des pigments, impuretés et stéroïdes peu polaires. On utilise les systèmes de solvant suivants :

- éther de pétrole, méthanol, eau (116).
- benzène, eau (14).
- toluène, ligroïne, méthanol, eau (105-178).

La chromatographie d'adsorption sur gel de silice (112-113-124-149-151) sur Kieselguhr (6) et sur Florisil (64-81-117-134) est une méthode efficace de purification.

Le gel de silice est d'une préparation délicate. Le Florisil (silicate de magnésium synthétique) est intéressant car les composés polaires s'en laissent facilement éluer. Cette technique permet d'enlever les pigments, les impuretés chromogènes, les 17 cétostéroïdes et les stéroïdes peu polaires.

La chromatographie sur papier a également été préconisée. DYRENFURTH et VENNING (43) proposent un système chromatographique à une seule phase, dérivé du système de SCHMIDT et STAUDINGER. En chromatographie descendante dans l'eau saturée d'heptanol (phase stationnaire et mobile) les impuretés, les pigments et les substances lipidiques restent sur la ligne de départ alors que les stéroïdes migrent. Mais les pertes de stéroïdes par adsorption (sur l'adsorbant ou sur la cellulose du papier) ne sont pas toujours négligeables.

SEPARATION DE L'ALDOSTERONE DES AUTRES STEROIDES

I. Systèmes proposés

La chromatographie de partage sur papier est la technique préférentielle pour l'isolement des stéroïdes (NEHER 179). L'électrophorèse sur papier, étudiée pour des stéroïdes de configuration voisine (MACKINLEY 92 - VOIGT et coll 166) n'a pas été appliquée à l'aldostérone.

BUSH et ZAFFARONI ont étudié des systèmes spécialement adaptés à l'analyse des hormones corticosurrénales.

a) les systèmes de BUSH (25 - 26)

BUSH a décrit des systèmes dans lesquels la phase stationnaire polaire (le plus souvent méthanol-eau) n'imprègne le papier que par l'intermédiaire de ses vapeurs. Le chromatogramme est ensuite développé par la phase mobile (saturée de phase stationnaire) de polarité moindre à une température variant de 30° à 38°.

Les systèmes les plus utilisés sont :

- le système BUSH B5 (benzène, méthanol, eau) dans lequel à 35° l'aldostérone migre entre la cortisone et l'hydrocortisone.

- le système BUSH C (toluène, acétate d'éthyle, méthanol, eau) dans lequel à 34° l'aldostérone migre en même temps que l'hydrocortisone.

b) Les systèmes de ZAFFARONI

ZAFFARONI et coll (174-175-176) BURTON et coll (23-24) utilisent au contraire des systèmes le plus souvent anhydres. Le papier imprégné de phase stationnaire polaire est développé immédiatement avec la phase mobile de polarité moindre (saturée de phase stationnaire) à la tem-

pérature du laboratoire (environ 20°). Ces auteurs recommandent l'utilisation du propylène glycol ou de la formamide comme phases stationnaires; toluène, benzène, éther de pétrole ou chloroforme constituant la phase mobile.

Les systèmes les plus utilisés sont :

- propylène glycol, toluène dans lequel l'aldostérone migre en 48 heures en même temps que la cortisone.

- formamide, chloroforme dans lequel l'aldostérone migre au niveau de la cortisone.

- formamide, benzène dans lequel l'aldostérone migre entre la cortisone et l'hydrocortisone.

c) comparaison des systèmes de BUSH et de ZAFFARONI

Systèmes de BUSH	
Avantages	Inconvénients
Séparation rapide	Contrôle rigoureux de la température
Chromatogramme facile à sécher	L'imprégnation du papier par la phase stationnaire est longue
Faible absorption de base du papier pour les déterminations spectrophotométriques	Faible capacité de charge
Absence d'effets de déplacements	

Systèmes de ZAFFARONI	
Avantages	Inconvénients
Assez grande capacité de charge	Séchage long du chromatogramme, car la phase stationnaire est difficile à éliminer.
Pas de contrôle de la température	Parfois des effets de déplacement
Imprégnation rapide du papier par la phase stationnaire	

Le type d'analyse à effectuer guide le choix entre ces deux sortes de systèmes. Le plus souvent pour la séparation de l'aldostérone on utilise d'abord un système

de ZAFFARONI qui se prête bien à la séparation des extraits grossiers puis un système de BUSH pour l'isolement final.

d) les systèmes dérivés de ceux de BUSH

EBERLEIN et BONGIOVANNI (51) utilisent du butanol tertiaire et de l'eau comme phase stationnaire, l'iso-octane constituant la phase mobile. Dans ce système (E2B) l'aldostérone (après une imprégnation du papier à une température supérieure de 10° à la température de développement) migre légèrement plus lentement que l'hydrocortisone.

DI PERRI, RAVENNI et RUBEGNI (44) proposent deux systèmes de BUSH inversés : phase stationnaire peu polaire et phase mobile polaire (méthanol aqueux). Dans le système "toluène, n octanol, méthanol, eau" et "toluène, pétrole léger, méthanol, eau", l'aldostérone à la température ordinaire migre entre la cortisone et l'hydrocortisone.

PECHET (126-127) et TUZSON (157) adaptent les systèmes de BUSH aux stéroïdes polaires (développement à la température ordinaire). Le plus utilisé est le système PECHET n° 1 : "toluène, éther de pétrole, butanol, méthanol, eau".

e) les systèmes dérivés de ceux de ZAFFARONI

NOWACZINSKI et KOIW (123) trouvant le système "toluène, propylène glycol" trop long, proposent d'utiliser "éthylène glycol, toluène, chloroforme". En 48 heures à 21° l'aldostérone migre deux fois plus vite que l'hydrocortisone.

CRISTOL (41) utilise le système "propylène glycol, toluène, acétate d'éthyle". La séparation se fait en 5 heures à $34^{\circ} \pm 5^{\circ}$.

STARKA et PRUSIKOWA (130-150) adoptent le système "éthylène glycol, toluène (ou tétrachlorure de carbone) dans lequel l'aldostérone migre entre la cortisone et l'hydrocortisone. Ils notent l'intérêt de l'éthylène glycol qui ne perturbe pas les réactions colorées des stéroïdes.

f) chromatographie en phases inversées

La chromatographie en phases inversées consiste à utiliser, contrairement aux systèmes classiques, une phase stationnaire peu polaire et une phase mobile plus polaire.

CARR et REDDY (30) décrivent un système où la mobilité de l'aldostérone est très augmentée. La phase stationnaire est constituée par une feuille d'acétate de cellulose (projection d'acétate de cellulose liquide sur une plaque de verre). En 72 heures à une température de 26° dans les systèmes de solvants "eau, butanol tertiaire, éther de pétrole" ou "butanol tertiaire, benzène" on obtient une bonne séparation. Mais plusieurs facteurs (contrôle de la température, épaisseur uniforme de la feuille d'acétate de cellulose) sont nécessaires pour assurer une bonne reproductibilité.

g) autres systèmes

STAUB et DINGMAN (151) séparent l'aldostérone par chromatographie sur papier de verre imprégné de phosphate monopotassique (solvants : benzène, diméthylformamide-cyclohexane, acétone-toluène, acétate d'éthyle). Le développement du chromatogramme est rapide (15 à 20 minutes) et les variations de température ont peu d'importance.

Deux publications japonaises récentes (68-111) soulignent l'importance de l'eau comme solvant chromatographique pour les corticostéroïdes. NAKAO et coll (111) les chromatographient sur papier Whatman n° 1 à une température de 25° avec de l'eau distillée comme phase mobile et stationnaire. INABA et coll -(68) améliorent la séparation de la cortisone, de l'hydrocortisone et de l'aldostérone en utilisant un papier (Whatman n° 2) imprégné de florissil. Il s'agit en fait non plus d'une chromatographie de partage, mais d'une véritable chromatographie d'adsorption. Ces systèmes présentent l'avantage de ne pas entraîner les impuretés, les pigments et les lipides au cours de la migration.

Enfin citons les études d'EDWARDS (52) sur la chromatographie bidimensionnelle des corticostéroïdes.

II. Systèmes utilisés

Les solvants et les méthodes chromatographiques donnent en général de bons résultats avec des solutions pures de stéroïdes. Les applications aux milieux biologiques, le choix de l'un ou de l'autre dépendent évidemment du matériel à chromatographier et des conditions de travail.

La plupart des auteurs utilisent deux à trois systèmes chromatographiques pour l'isolement de l'aldostérone :

NOWACZINSKI et coll successivement "éthylène glycol, toluène, chloroforme" "E2B" et "BUSH B5".

Presque tous emploient un système de type ZAFFARONI, qui se prête bien à la séparation des extraits grossiers, puis un système de type BUSH dans lequel il n'y a pas d'effet de déplacement.

DYRENFURTH et VENNING (43) préfèrent le système E2B pour pratiquer ultérieurement la réaction à la 2,4-dinitrophénylhydrazine.

Certains systèmes se prêtent mieux à la séparation de dérivés de l'aldostérone. CHEN (36) utilise pour la purification de l'hydrazone salicylique de l'aldostérone le système "benzène saturé d'eau" (à la fois phase saturante et éluante).

Les acétates d'aldostérone sont chromatographiés par NEHER et WETTSTEIN (115) dans les système de BUSH, de ZAFFARONI et E2B; par SOBEL et coll (149) dans le BUSH B3 ; par MATTOX, MASON et ALBERT (102) dans "formamide, cyclohexane, benzène" et par BROOKS dans le BUSH A (21).

Le dosage de l'aldostérone s'effectue soit par comparaison visuelle directement sur le chromatogramme, soit par photométrie après élution. Dans ce dernier cas, le papier risque de céder des impuretés ou simplement des débris qui interfèrent dans les dosages spectrophométriques. Pour cette raison les papiers sont lavés : soit au Soxhlet pendant 72 heures par le mélange "benzène, méthanol (123) ou pendant 48 heures par le méthanol puis 48 heures par le chloroforme (43) - soit en chromatographie descendante à la soude 2N, puis à l'eau, puis à l'éthanol à 95° (87).

La purification peut s'effectuer après l' élution : OERTEL et EIK-NES (126) lavent les extraits de papier par l'acide sulfurique à 0,5 %, puis deux fois par l'eau.

La phase stationnaire qui imprègne le papier (dans les systèmes de type ZAFFARONI) risque de donner des résidus d'aspect huileux. NEHER et WETTSTEIN (cités dans 81) proposent de sécher le chromatogramme à l'air chaud, d'éluier le spot, d'étendre l'éluat avec de l'eau et d'extraire l'aldostérone par le chloroforme.

III. Conclusion

De nouvelles techniques chromatographiques ont fait leur apparition ces dernières années. Il est probable qu'elles seront d'un grand intérêt dans la séparation de l'aldostérone des milieux biologiques.

La chromatographie en couches minces a été étudiée pour les corticostéroïdes mais pas pour l'aldostérone. MATTIS et coll sur couche de sulfate de calcium (100), A-DAMEC et coll sur couche de gel de silice (1) et METZ sur couche de Kieselguhr (104) ont obtenu des séparations satisfaisantes. La rapidité de migration (environ une heure) et la possibilité d'employer des réactifs agressifs pour repérer les stéroïdes (acide sulfurique) rendent cette technique intéressante.

La chromatographie en phase gazeuse permet d'analyser l'aldostérone sous la forme de son 18,21 diacétate et de la séparer de la cortisone (80-173). Par contre l'aldostérone libre ou son monoacétate en 21 sont détruits au cours de l'opération (161). Cette technique est rapide et ne demande qu'une faible prise d'essai.

§

DETERMINATION QUANTITATIVE

La détermination quantitative se pratique soit directement sur le chromatogramme, soit après élution du spot d'aldostérone. Dans les deux cas on doit préalablement repérer la position du stéroïde sur le chromatogramme en mettant à profit la forte absorption de la lumière ultraviolette par le groupement Δ^4 -3-céto.

a) par comparaison visuelle sur le chromatogramme

Les formazans obtenus par réduction des sels de tétrazolium sont appréciés soit visuellement par rapport à des spots témoins d'aldostérone (119), soit par une méthode planimétrique (OERTEL 125).

Certains auteurs préfèrent éluer le formazan formé, par le mélange "méthanol, acétate d'éthyle" (154), par le tétrahydrofurane (66) ou par la pyridine chlorhydrique (67) et apprécier l'intensité de la coloration à l'aide d'un spectrophotomètre.

La réaction de fluorescence aux alcalins (BUSH 25) est la base d'une méthode fluorimétrique de dosage. AYRES et coll (6) décrivent une technique qui permet la détection de moins d'un microgramme d'aldostérone. BROOKS (21) mesure la fluorescence du diacétate d'aldostérone.

b) par photométrie après élution

L'élution du spot correspondant à l'aldostérone peut se faire de diverses façons.

Le papier coupé en petits morceaux est soit recouvert d'éthanol pendant une heure (CHEN 36), soit d'eau à partir de laquelle on extrait l'aldostérone par le chloroforme (VERNON et coll 163).

L'élution peut se pratiquer en chromatographie descendante par le méthanol dans une enceinte saturée de méthanol (LABADIE 81 - HERNANDO et coll 64). NOWACZINSKI et coll utilisent le dispositif de HAINES modifié et éluent par l'éthanol puis par le chloroforme (121-124).

Pour les dosages spectrophotométriques, bien que l'on utilise des papiers lavés, il est nécessaire de déduire l'absorption de base et les réactions parasites éventuelles du papier en faisant un témoin papier.

La réduction des sels de tétrazolium en milieu alcalin est employée par de très nombreux auteurs (12-19-45-81-113-134). L'alcalin utilisé est soit la soude, soit un ammonium quaternaire (64-124). La réaction se développe à l'obscurité puis est stoppée par addition d'acide acétique glacial (64-124). L'étalonnage est fait avec de l'hydrocortisone (64-81) ou avec de l'aldostérone.

MELBY (153) utilise l'oxydation cuivrique de la chaîne α cétoïque en chaîne glyoxalique donnant la réaction de PORTER et SILBER.

La formation d'hydrazones sur le groupement cétonique actif en 3 a été étudié. La 2,4-dinitrophénylhydrazine est utilisée par MOOLENAR et QUERIDO (105-178), l'hydrazide salicylique par CHEN (36). On note une certaine spécificité pour la 2,4-dinitrophénylhydrazone de l'aldostérone, qui possède un spectre d'absorption assez différent des autres stéroïdes voisins.

La réaction de fluorescence aux alcalins peut être faite en tube. STAUB et DINGMAN utilisent le butoxyde tertiaire de potassium comme agent alcalin (151).

Le plus souvent les auteurs recommandent de pratiquer 2 ou 3 réactions pour la caractérisation et la détermination quantitative de l'aldostérone. NOWACZINSKI et coll la caractérisent par les spectres dans les acides (121) et la dosent par la réaction au bleu de tétrazolium et le spectre d'absorption dans l'ultra-violet de la solution alcoolique (124).

RESULTATS

a) causes d'erreur

Les travaux importants de NOWACZINSKI, STEYERMARK, KOIW, GENEST et JONES (121) et de NOWACZINSKI, KOIW et GENEST (124) ont montré que dans certains systèmes chromatographiques la zone correspondant à l'aldostérone contenait en fait plusieurs corps.

Dans le système "éthylène glycol, toluène" ils ont identifié au niveau de l'aldostérone : l'aldostérone, la II-déhydroaldostérone, les composés III, IV, V, VI et VII. Ces composés sont des Δ^4 -3-céto et perturbent les réactions de ce groupement. Les composés III et IV sont parfois porteurs d'impuretés à propriétés réductrices vis-à-vis des sels de tétrazolium.

Dans le système "BUSH B5" l'aldostérone et la II-déhydroaldostérone migrent au même niveau.

L'étude détaillée de ces composés a été faite par NOWACZINSKI et coll. Ils indiquent les systèmes chromatographiques permettant de les séparer et font l'étude analytique des composés par les réactions de caractérisation de l'aldostérone.

DYRENFURTH et VENNING (43) ont retrouvé le composé V de GENEST qui migre près de l'aldostérone dans le système "BUSH B5". CHEN (36) cite le même composé migrant comme l'aldostérone dans le système "BUSH C" et "E2B".

Pour éliminer le maximum de causes d'erreur, NOWACZINSKI et coll (121) proposent la méthode suivante : purification par chromatographie sur gel de silice et séparation par trois chromatographies de partage sur papier dans les systèmes "propylène glycol, toluène" - "E2B" - "BUSH B5".

b) Conclusion

La spécificité des méthodes que nous venons d'étudier dépend de la pureté du corps isolé. C'est pourquoi certains auteurs préfèrent transformer l'aldostérone en un dérivé tel le diacétate avant d'appliquer les techniques de dosage; ce qui représente une purification supplémentaire (6).

Les réactions basées sur l'utilisation des sels de tétrazolium et sur la formation d'hydrazones sont d'une sensibilité suffisante pour permettre des dosages de routine. Mais l'introduction des réactions utilisant la fluorescence par les alcalins (sur papier ou en tube) permet le dosage de faibles quantités d'aldostérone (STAUB et DINGMAN 151 indiquent une sensibilité de 0,25 à 0,50 microgramme). Cependant les seules méthodes présentant une grande sensibilité sont celles utilisant les corps marqués.

* * *

IV. LES METHODES DE DOSAGE DE L'ALDOSTERONE UTILISANT LES CORPS MARQUES

Ces techniques ont l'intérêt de permettre simultanément la détermination quantitative de l'aldostérone et le calcul des pertes se produisant au cours des manipulations. Elles sont très spécifiques et précises.

TECHNIQUE PAR MARQUAGE DE LA MOLECULE D'ALDOSTERONE

JONES et coll (71) ajoutent à l'extrait urinaire de l'aldostérone marquée au tritium. L'aldostérone, séparée par chromatographie, est acétylée puis dosée par fluorimétrie et par la mesure de la radioactivité. L'addition de cortisol marqué permet le calcul des pertes.

TECHNIQUE PAR MARQUAGE DE L'ACIDE ESTERIFIANT L'ALDOSTERONE

a) estérification par l'anhydride acétique marqué au tritium puis addition de diacétate (marqué par le carbone 14) d'aldostérone ; ce sont les méthodes de AYRES et coll (6) et de KLIMAN et PETERSON (79).

b) estérification par le pipsan (anhydride de l'acide p-iodobenzènesulfonique) marqué par le soufre 35, puis addition de p-iodobenzènesulfonate (marqué par l'iode 131) d'aldostérone, c'est la méthode de BOJESSEN et DEGN (17).

RESULTATS

La sensibilité et la précision de ces techniques ont permis le dosage de très faibles quantités d'aldostérone (KLIMAN et PETERSON détectent 0,01 microgramme d'aldostérone). On a ainsi pu déterminer le taux de l'aldostéronémie et le taux de l'aldostérone libre dans l'urine (JONES et coll = 0,44 microgramme par 24 heures). L'injection d'aldostérone marquée au tritium permet de mesurer le taux de sécrétion d'aldostérone, soit par mesure de l'activité spécifique de l'aldostérone mise en liberté dans l'urine par hydrolyse acide (FLOOD et coll 57), soit par mesure de l'activité spécifique d'un métabolite tétrahydrogéné (ULICK et coll 158). Les derniers chiffres donnés par FLOOD et coll (1961) indiquent un taux moyen de sécrétion égal à 77 microgrammes par 24 heures. D'autres résultats plus élevés ont été donnés (ULICK et coll 1958) 200 microgrammes par 24 heures.

Cependant l'utilisation de ces techniques requiert un appareillage coûteux et de grandes précautions opératoires. Il est nécessaire d'isoler l'aldostérone dans un état hautement purifié; ce qui demande la mise en oeuvre de 3 ou 4 séparations chromatographiques.

Certains réactifs sont d'un emploi malaisé : le p-iodobenzènesulfonate d'aldostérone est instable et la chromatographie doit être pratiquée à basse température.

§

V. CONCLUSION

Les méthodes de dosage de l'aldostérone basées sur l'utilisation des corps marqués représentent les techniques de choix, grâce à leur précision et à leur spécificité. Mais elles sont délicates à mettre en oeuvre et sont d'un prix de revient élevé. On les réservera pour les recherches sur le métabolisme de l'aldostérone. Pour les dosages de routine, les méthodes chimiques, bien qu'imparfaites, semblent suffisantes.

TROISIEME PARTIE

TECHNIQUES PERSONNELLEMENT
UTILISEES

Nous avons principalement étudié les systèmes chromatographiques de séparation de l'aldostérone et les méthodes d'estimation quantitative. Nous envisageons cependant les différentes étapes du dosage de l'aldostérone urinaire dans l'ordre où nous les avons présentées au chapitre précédent.

*

I. HYDROLYSE - EXTRACTION - PURIFICATION

RECUEIL DES URINES

Les urines sont recueillies sur 2 centigrammes de cyanure mercurique ou sur 2 centigrammes d'acide mercuri-thiosalicylique. Si l'extraction est différée, les urines doivent être conservées au réfrigérateur à + 4°.

HYDROLYSE - EXTRACTION

L'hydrolyse par l'acide chlorhydrique est le procédé le plus satisfaisant pour libérer l'aldostérone urinaire de sa forme conjuguée (forme 3 céto-conjuguée). Les travaux d'UNDERWOOD et coll (160) ont montré que les différentes techniques d'hydrolyse chlorhydrique sont toutes valables. Nous avons adopté la technique de MOOLENAR (105): hydrolyse chlorhydrique suivie d'une extraction de 24 heures.

Technique : l'urine (en général la demi-diurèse de 24 heures) est amenée à pH 1 par de l'acide chlorhydrique concentré, puis est saturée de chlorure de sodium pour éviter les émulsions (NEHER et WETTSTEIN 112). On procède à une première extraction de 3 heures par 100 cm³ de chloroforme sur un agitateur va et vient. Après ce temps, le chloroforme est séparé par centrifugation. On fait une nouvelle extraction de 3 heures par 100 cm³ de chloroforme, puis une extraction de 16 heures par 200 cm³ de chloroforme, et enfin une dernière extraction de 2 heures par 100 cm³ de chloroforme. Au terme de chaque extraction le chloroforme est séparé par centrifugation.

Les extraits chloroformiques réunis sont lavés successivement par 2 fois 25 cm³ de soude normale, 2 fois 25 cm³ de soude décinormale et 2 fois par 25 cm³ d'une solu-

tion aqueuse saturée de chlorure de sodium. On élimine ainsi une grande partie des pigments urinaires. Nous préférons utiliser pour le dernier lavage une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium à la place d'eau distillée. En effet nous éliminons ainsi non seulement l'excès de soude, mais aussi une partie de l'eau contenue dans le chloroforme.

Les extraits chloroformiques sont alors mis à sécher 12 heures au réfrigérateur sur sulfate de sodium anhydre, à raison de 20 grammes par litre de chloroforme.

Les extraits sont évaporés sous vide à une température voisine de 40°. Le résidu est repris par 2 cm³ de chloroforme (plus une goutte d'éthanol absolu). La solution est évaporée dans un petit tube à une température voisine de 40° en s'aidant du vide. On pratique avec soin cette reprise 2 ou 3 fois.

L'extrait est alors mis à sécher dans un dessiccateur à vide sur actigel.

PURIFICATION DES EXTRAITS URINAIRES

Nous avons pratiqué la purification par chromatographie d'adsorption sur colonne et par partage entre un solvant polaire et un solvant non polaire.

La chromatographie d'adsorption peut se réaliser sur divers adsorbants : gel de silice, kieselguhr, florisil (silicate de magnésium synthétique).

Nous avons adopté le florisil à partir duquel on peut facilement éluer les composés polaires et avons suivi la technique de NELSON (117).

Technique : le florisil réactivé par lavage à l'éthanol absolu et séchage au four à moufle (à 600° pendant 4 heures) est placé dans une allonge en verre de 1 cm de diamètre sur une hauteur de 7 cm. On humecte la colonne avec 5 cm³ de chloroforme pur, puis sans laisser sécher la colonne on fait passer l'extrait urinaire dissous dans 5 cm³ de chloroforme.

L'élution fractionnée des constituants de l'extrait est faite par des solutions contenant des quantités croissantes d'éthanol : 0,5 - 2 - 20 cm³ d'éthanol absolu pour 100 cm³ de chloroforme. Les deux premiers éluats (0,5 et 2 %) contenant les stéroïdes non polaires (entre autres les 17-cétostéroïdes) sont rejetés, tandis que le dernier

contenant les stéroïdes polaires (dont l'aldostérone) est conservé puis évaporé. L'humidité modifiant le pouvoir adsorbant du florisil, tout le matériel utilisé doit être préalablement séché à l'étuve.

Pour le partage nous avons utilisé le mode opératoire préconisé par MOOLENAR (106).

Technique : l'extrait urinaire est dissous dans 2 cm³ d'une solution aqueuse de méthanol préparée extemporanément (7 parties de méthanol, 3 parties d'eau distillée, volume à volume). On ajoute 0,5 cm³ du mélange "éther de pétrole-toluène" (parties égales volume à volume) préparé extemporanément.

On agite par retournements lents et on élimine la phase supérieure non polaire par capillarité à l'aide de bandelettes de papier filtre. On pratique cette opération deux fois.

RESULTATS

L'aldostérone, stéroïde polaire, reste dans la phase "méthanol-eau", tandis que les impuretés chromogènes passent dans la phase organique et sont éliminées.

* * *

II. SEPARATION DE L'ALDOSTERONE

L'extrait urinaire purifié contient principalement l'aldostérone, la cortisone et l'hydrocortisone. Ces trois corps possédant des réactions de caractérisation identiques, on sépare l'aldostérone par chromatographie de partage sur papier.

Un seul système chromatographique n'est pas suffisant pour assurer une séparation correcte. Dans un premier temps on utilise un système de type ZAFFARONI se prêtant bien à la séparation des extraits grossiers, puis dans un deuxième temps un système de type BUSH dans lequel les effets de déplacement sont faibles.

Première chromatographie

Nous avons utilisé le système "toluène-propylène glycol" de ZAFFARONI.

Technique : la phase stationnaire polaire est constituée par du propylène glycol, la phase mobile par du toluène saturé de propylène glycol. Le chromatogramme est constitué par une bande de 12 cm sur 43 cm, découpée dans du papier Whatman n° 1. La ligne de départ est située à 12 cm d'une extrémité de la feuille, tandis que l'autre extrémité est découpée en dents de scie pour permettre au solvant de s'écouler uniformément. Le papier est imprégné de phase stationnaire par passage dans une solution de propylène glycol dans le méthanol (parties égales volume à volume) puis essoré entre deux feuilles de papier filtre.

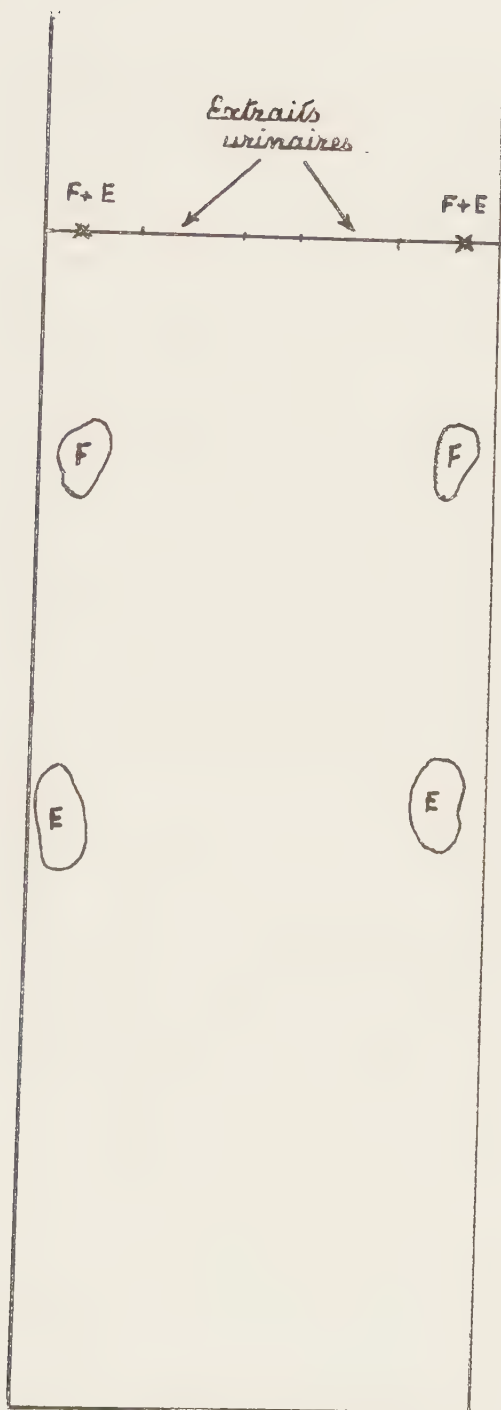


FIGURE N°1. Chromatogramme obtenu après 48 heures de migration dans le système *toluène-propylène-glycol*.
 Les distances moyennes parcourues par les stéroïdes témoins (mesurées au centre du spot) sont : pour la cortisone (E) 14 cm
 pour l'hydrocortisone (F) 5,6 cm

On dépose sur la ligne de départ les extraits urinaires dissous dans le mélange "chloroforme-méthanol" (4:1 en volume) sur une largeur de 2 cm et sur les côtés de la feuille, d'une manière punctiforme, des témoins de cortisone et d'hydrocortisone.

Le chromatogramme est porté dans la cuve à chromatographie et on attend environ 3 heures avant de commencer la migration de manière à atteindre l'équilibre entre le papier et l'atmosphère de la cuve. Puis on verse la phase mobile et on laisse la chromatographie se poursuivre 48 heures à la température du laboratoire. Le chromatogramme est séché et on repère en lumière ultra-violette à 240 mμ les stéroïdes témoins. L'exposition du chromatogramme à la lumière ultra-violette doit être brève de manière à ne pas amener une altération structurale du stéroïde. L'aldostérone migrant dans ce système légèrement plus que la cortisone, on découpe la zone de papier correspondante sur le trajet des extraits urinaires. Cette zone est éluée en chromatographie descendante par le mélange "chloroforme-méthanol" (7:3 en volume) pendant 24 heures.

RESULTATS

Nous avons utilisé ce système pour plus de 300 extraits urinaires et il nous a donné satisfaction par sa reproductibilité.

Nous n'avons pas observé de grands effets de déplacement comme le signale BUSH. Par contre le chromatogramme est long à sécher et souvent il n'est pas possible d'éliminer complètement le propylène glycol qui donne des résidus d'évaporation d'éluates d'aspect huileux.

Deuxième chromatographie

La majorité des auteurs utilisent des systèmes de type BUSH pour la séparation terminale de l'aldostérone. En effet l'absence d'effets de déplacement, la facilité de séchage du chromatogramme et la faible absorption de base du papier les font préférer aux systèmes de ZAFFARONI surtout lorsque l'aldostérone doit être dosée par spectrophotométrie après élution.

I. Systèmes de type BUSH

Système d'EBERLEIN BONGIOVANNI "E2B" (51)

Le solvant est constitué par le mélange :

-- butanol tertiaire	5 parties
-- eau	9 "
-- isooctane	10 "

(en volume).

Comme dans tous les systèmes de type BUSH la phase stationnaire (mélange butanol tertiaire-eau saturé d'isooctane) n'impregne le papier que par l'intermédiaire de sa phase vapeur. On devrait donc laisser le chromatogramme de 12 à 24 heures dans la cuve avant de commencer la chromatographie. Mais l'augmentation de la température pendant cette imprégnation (10° au-dessus de la température du laboratoire) permet de réduire ce temps à 6 heures.

Le chromatogramme est développé par de l'isooctane saturé du mélange butanol tertiaire-eau et on obtient une bonne séparation en 8 heures à la température du laboratoire (l'aldostérone migre plus lentement que la cortisone).

Le contrôle rigoureux de la température pendant la saturation de la feuille en vapeurs de solvant constitue une complication technique. Nous avons alors abandonné les systèmes classiques de BUSH.

Systèmes de DI PERRI et coll (44)

Ce sont des systèmes de BUSH inversés dans lesquels la phase stationnaire est peu polaire et la phase mobile polaire.

Nous avons utilisé le système :

- toluène	40 parties
- pétrole léger	70 "
- méthanol	70 "
- eau	30 "

(en volume).

En 5 à 6 heures à la température ordinaire l'aldostérone migre entre la cortisone et l'hydrocortisone. Cependant nous n'avons jamais pu obtenir de séparation correcte avec ce système.

Nous avons abandonné les systèmes de BUSH pour ceux de ZAFFARONI.

II. Systèmes de type ZAFFARONI

Système de MATTOX et LEWBART (103)

La phase stationnaire polaire est de l'éthylène glycol, la phase mobile et saturante est constituée par la phase supérieure du mélange :

- acétate de butyle	20	parties
- éthylène-glycol	1	"
- eau	1	"

(en volume).

Le papier (Whatman n° 1) est imprégné de phase stationnaire par passage dans le mélange "éthylène-glycol à 40 % dans l'acétone", puis essoré rapidement entre deux feuilles de papier filtre.

Sur la ligne de départ on dépose sur une largeur de 1 cm les extraits urinaires dissous dans le mélange "chloroforme-méthanol 4:1 (en volume)" et sur les côtés des témoins d'aldostérone et de cortisone.

L'équilibre entre le papier et l'atmosphère de la cuve est atteint assez rapidement (environ 3 heures). En 6 heures à la température du laboratoire on obtient une séparation satisfaisante (figure n° 2).

Nous avons noté cependant des effets de déplacement importants et nous avons eu des difficultés à fixer le temps de migration. De plus le chromatogramme est long à sécher.

Pour minimiser les effets de déplacement et repérer parfaitement la position des stéroïdes, nous ajoutons de la cortisone aux extraits urinaires, comme entraîneur.

* * *

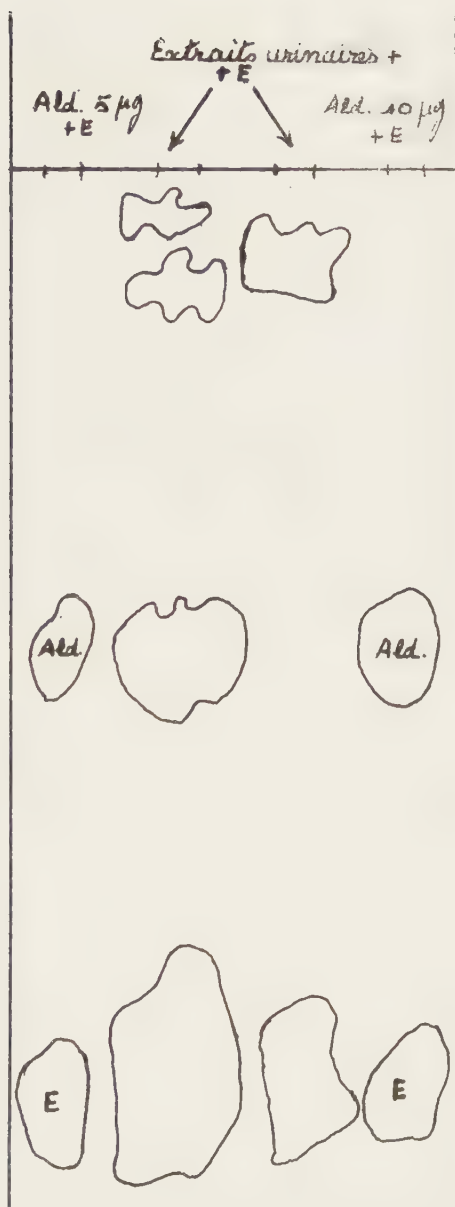


FIGURE N° 2. Chromatogramme obtenu après 6 heures de migration dans le système acétate de butyle-éthylène glycol-eau à la température ordinaire

Les distances moyennes parcourues par les stéroïdes témoins (mesurées au centre de la tache) sont : pour l'aldostérone (Ald) 12,6 cm
pour la cortisone (E) 24,5 cm

III. DETERMINATION QUANTITATIVE DE L'ALDOSTERONE

La détermination quantitative de l'aldostérone est basée sur la présence des groupements suivants : chaîne latérale α cétoïque en 17 et groupement $\Delta 4-3$ -céto.

Nous avons étudié la réduction du bleu de tétrazolum en milieu alcalin (due à la chaîne latérale) et la formation d'hydrazones sur le carbonyle en 3 par l'hydrazide salicylique et l'hydrazide isonicotinique. La réduction du bleu de tétrazolum est pratiquée directement sur le chromatogramme, alors que les formations d'hydrazones sont faites après élution de l'aldostérone.

La réaction au bleu de tétrazolum

L'aldostérone réduit le chlorure de 3-3' dianisole 4-4' bis (3-5 diphényl) tétrazolum ou bleu de tétrazolum en un formazan de coloration bleue.

Réactifs

1. Solution aqueuse de bleu de tétrazolum à 0,40 gramme %
2. " " de soude à 10 "

Au moment de l'emploi faire le mélange :

- Réactif 1:2 parties

- Réactif 2:1 partie.

(en volume).

Technique

On pulvérise sur le chromatogramme sec le mélange précédent. La réaction est complète en 5 minutes et on apprécie visuellement l'intensité et la surface de la tache bleue correspondant à l'aldostérone sur le trajet de l'extrait urinaire par rapport aux spots témoins de d-1 aldostérone. La d-1 aldostérone nous a été fournie gracieusement par les laboratoires CIBA que nous remercions ici.

Nous utilisons des témoins de 5 et 10 microgrammes d'aldostérone. Le chromatogramme est lavé à l'eau, puis placé entre deux feuilles de papier filtre à l'obscurité. De cette manière les taches restent visibles et interprétables très longtemps.

* La d-1 aldostérone nous a été fournie gracieusement par les Laboratoires CIBA que nous remercions ici.

RESULTATS -- Cette méthode simple et rapide nous a donné d' excellents résultats. Elle est sensible et permet de détecter environ 1 microgramme de stéroïde. Mais l'interprétation des chromatogrammes est délicate, la précision étant fonction de l'appréciation personnelle. Cependant BAULIEU et JAYLE estiment que l'appréciation-visuelle donne des résultats identiques à la densitométrie et que pour un observateur entraîné l'erreur est inférieure à $\pm 20\%$ (13). Il faut éviter de pulvériser le réactif trop près du chromatogramme pour ne pas provoquer un déplacement des spots par capillarité.

La réaction à l'hydrazide salicylique

CAMBER a montré que l'hydrazide salicylique peut se combiner aux aldéhydes et aux cétones pour conduire à la formation d'hydrazones (27).

CHEN a appliqué cette réaction à la détermination de l'aldostéronurie (36). L'hydrazone de l'aldostérone possède un spectre d'absorption dans l'ultra-violet qui peut servir à son dosage.

Le principe de la réaction est le suivant : on fait agir l'hydrazide salicylique sur l'aldostérone, puis on sépare l'excès de réactif par chromatographie sur papier. L'hydrazone de l'aldostérone est éluée puis dosée par spectrophotométrie.

A) Réactifs

-- Solution d'hydrazide salicylique : on dissout 13,6 milligrammes d'hydrazide salicylique dans 10 cm³ d'éthanol absolu. Nous avons préparé l'hydrazide salicylique par synthèse suivant la méthode de BONDI (18).

On condense 30,4 grammes de salicylate de méthyle et 14,7 grammes d'hydrate d'hydrazine au bain-marie sous réfrigérant à reflux pendant 2 heures 15 minutes. Au bout de ce temps commence une légère cristallisation qui devient totale par refroidissement. Les cristaux obtenus sont lavés à l'éther qui enlève l'excès de salicylate de méthyle. On fait cristalliser à chaud dans l'éthanol à 95°. Le produit obtenu est incolore et possède un point de fusion de 147°.

- Acide acétique glacial
- Ethanol absolu.

B) Technique proposée par CHEN

Les essais sont réalisés sur de l'aldostérone pure.

1. Réaction avec l'hydrazide salicylique

La réaction se pratique sur une partie aliquote de la solution étalon d'aldostérone (solution éthanolique à 10 microgrammes par cm³) que l'on évapore au bain-marie à une température voisine de 40° en s'aidant du vide.

On ajoute successivement : 0,10 cm³ de la solution d'hydrazide salicylique.

0,010 cm³ d'acide acétique glacé (nous n'avons pas étudié la réaction en milieu alcalin).

0,50 cm³ d'éthanol absolu.

Le tube est porté au bain-marie à 60° pendant 30 minutes, puis on évapore les solvants sous azote en maintenant le tube au bain-marie.

2. Séparation de l'excès de réactif

L'excès de réactif est éliminé par chromatographie descendante dans le système "benzène-eau" (le benzène saturé d'eau constitue la phase mobile et saturante). Dans ce système, l'hydrazone de l'aldostérone ne migre pas alors que l'excès de réactif, les stéroïdes ne réagissant pas, et les impuretés sont déplacés.

L'hydrazone de l'aldostérone en solution dans le mélange "méthanol-chloroforme 2:1" (en volume) est déposée sur une feuille de papier Whatman n° 1 de 12 cm sur 43 cm. Avant de commencer le développement du chromatogramme par du benzène saturé d'eau on attend environ 12 heures pour atteindre l'équilibre entre le papier et l'atmosphère de la cuve. On laisse la chromatographie se poursuivre 12 heures et on sèche le chromatogramme jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'odeur benzénique.

3. Elution de l'hydrazone

La zone correspondant sur le papier à l'hydrazone de l'aldostérone est découpée puis éluee dans un petit tube bouchant émeri avec 2,5 cm³ d'éthanol absolu à 50 %.

Le tube est porté dans la veilleuse d'un bec Bunzen jusqu'à ébullition commençante. Lorsque le tube est refroidi on mesure les densités optiques au spectrophotomètre (Graphi spectral JOUAN) contre 2,5 cm³ d'éthanol absolu à 50 %.

4. RESULTATS obtenus

a) spectres des hydrazones de l'aldostérone et de l'hydrocortisone

Ces spectres ont été réalisés sur les hydrazones de 20 microgrammes d'aldostérone et d'hydrocortisone, de 230 à 360 m μ . Pour l'aldostérone nous avons dû diluer le produit de la réaction au 1/3. Nous n'avons pas tenu compte d'un témoin papier puisqu'il s'agit seulement d'une étude qualitative.

En accord avec CHEN nous avons trouvé un maximum à 298 m μ , une petite bosse à 308,309 m et un minimum à 260, 265 m μ . (figure n° 3).

L'hydrazide salicylique (quantité requise pour la réaction soit 0,10 cm³ de solution) possède une absorption très intense avec un maximum à 295 m μ .

b) courbe d'étalonnage

A partir du spectre on peut déterminer la densité optique correspondante à une quantité connue d'aldostérone. Pour cela il faut tenir compte de l'absorption de base du papier qui sert de support à l'hydrazone sur le chromatogramme. CHEN indique que la correction d'ALLEN est satisfaisante. On mesure les densités optiques à 270,295 et 320 m μ et on en déduit la densité optique corrigée à 295 m μ en appliquant la formule :

$$\text{absorption à } 295 \text{ m}\mu = \frac{\text{absorption à } 270 \text{ m}\mu + \text{absorption à } 320 \text{ m}\mu}{2}$$

Nous avons obtenu les résultats suivants :

Prise d'essai	Densité optique corrigée à 295 m μ
2 microgrammes	0,013
4 "	0,048
6 "	0,074
8 "	0,089
10 "	0,108
15 "	0,237
20 "	0,331

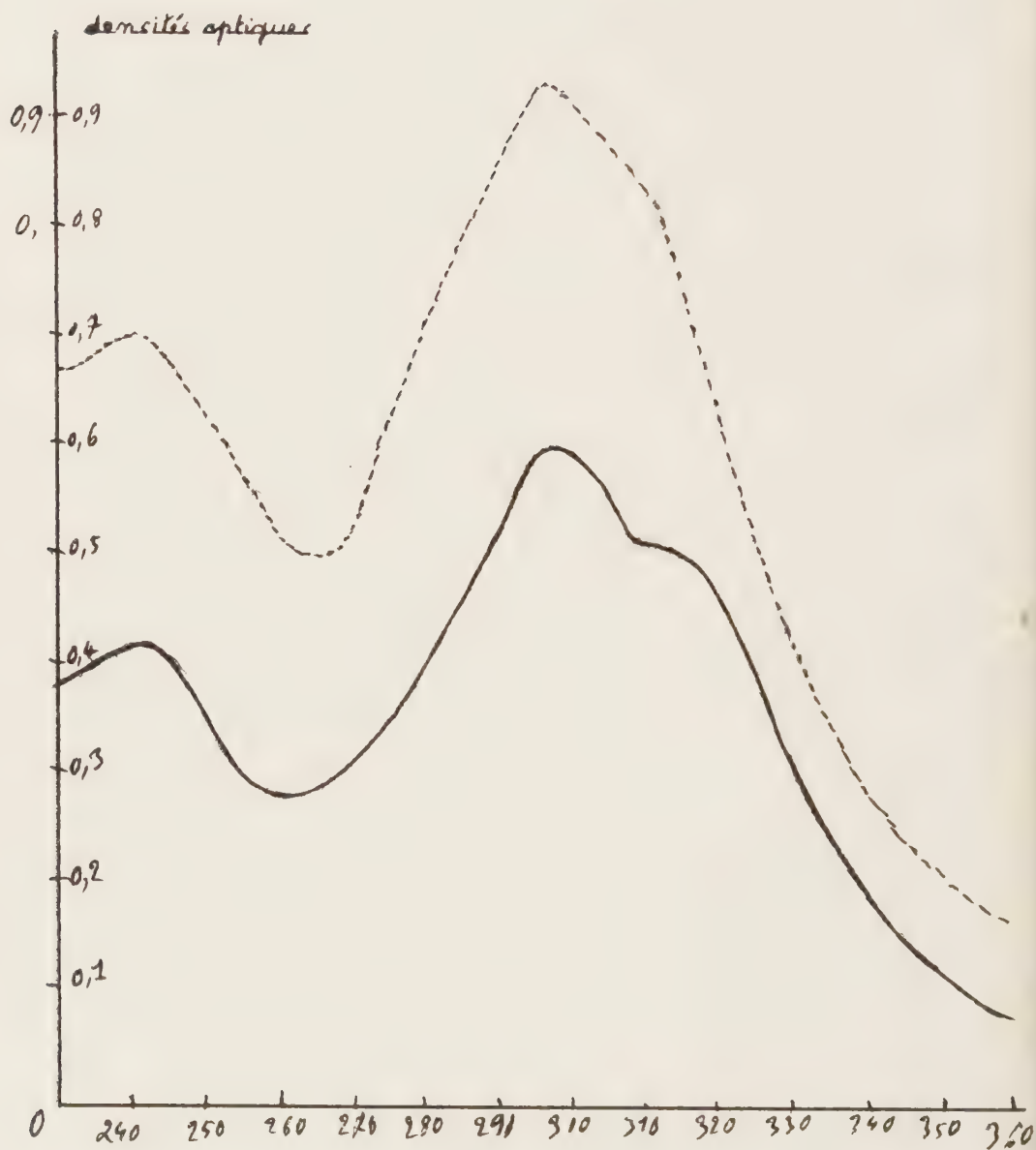


FIGURE N° 3. Spectres des hydrazones salicyliques de l'aldostérone : —
et de l'hydrocortisone - - -

c) Conclusion

Le tableau précédent montre que les résultats obtenus sont difficilement interprétables par suite soit d'une élution incomplète de l'hydrazone, soit d'une mauvaise élimination de l'excès de réactif.

§

C) Etude détaillée et modifications apportées à la réaction

1. Etude de la séparation de l'excès de réactif

a) par chromatographie sur papier dans le système "benzène-eau"

On étudie d'abord la migration de l'hydrazide salicylique dans le système "benzène-eau".

On dépose sur le chromatogramme une quantité d'hydrazide salicylique égale à celle utilisée pour la réaction ; soit 0,10 cm³ d'une solution à 13,6 milligrammes d'hydrazide salicylique pour 10 cm³ d'éthanol absolu.

La chromatographie est conduite suivant la technique de CHEN mais avec des temps variables.

La zone où a été déposé l'hydrazine salicylique est éluee, puis on mesure la densité optique corrigée de l'éluat.

Nous avons obtenu les RESULTATS suivants :

Durée de la chromatographie dans le système "benzène-eau"	Densité optique corrigée à 295 mμ de l'éluat de la zone où l'on a déposé l' hydrazide salicylique
12 heures	0,025
24 "	0,015
60 "	0,004
72 "	0,000

Le réactif n'est éliminé complètement qu' après 72 heures de chromatographie, mais la faible quantité restant après 60 heures doit permettre d'utiliser ce temps de chromatographie.

On étudie ensuite la migration de l'excès d'hydrazide salicylique restant après formation de l'hydrazone de l'aldostérone. Cette vérification a été faite en cherchant si, en dessous du spot d'hydrazone de l'aldostérone sur le chromatogramme il restait de l'hydrazide salicylique après migration. Pour cela on découpe en dessous du spot de l'hydrazone une surface égale à celui-ci et on l'élue.

Nous avons obtenu les RESULTATS suivants :

Durée de la chromatographie dans le système "benzène-eau"	Densité optique corrigée à 295 m μ de l'éluat de la zone située sous le spot d'hydrazone salicylique de :	
	2 microgrammes d'aldostérone.	10 microgrammes d'aldostérone.
12 heures	0,055	
24 "	0,004	0,009
60 "	0,000	0,001
72 "	0,000	0,000

Ces résultats corroborent bien ceux obtenus avec l'hydrazide salicylique pure et nous pensons qu'une chromatographie de 60 heures est suffisante pour séparer l'excès de réactif.

Cependant cette technique de séparation étant trop longue, nous nous sommes intéressés à une technique par partage. CHEN l'a indiqué pour le dosage de la progestérone et de la testostérone et de leurs dérivés à l'état d'hydrazones salicyliques (36).

b) par partage entre solvants

Le produit de la réaction "hydrazone salicylique de l'aldostérone + excès d'hydrazide salicylique" est repris par du dichlorométhane. On effectue un partage entre ce solvant et une solution à 20 % d'éthanol dans l'acide chlorhydrique 0,1 N. L'hydrazone reste dans le dichlorométhane alors que l'hydrazide salicylique en excès passe dans la

phase alcoolo-aqueuse.

Technique : - ajouter 2 cm³ de dichlorométhane au produit de la réaction et chauffer doucement (le dichlorométhane possède un point d'ébullition très bas).

- agiter 3 fois avec la solution alcoolo-chlorhydrique, rejeter cette solution.

- ajouter 13 cm³ d'eau distillée. Il ne doit pas flotter de dichlorométhane à la surface. Rejeter l'eau distillée.

- ajouter 2 cm³ d'éthanol, le mélange ne doit pas se séparer en 2 phases.

- lire directement à 295 m μ . On fait un blanc sur l'eau.

RESULTATS : nous avons d'abord étudié cette technique sur 0,10 cm³ de la solution d'hydrazide salicylique.

- Densité optique corrigée de la phase

"méthanol dichlorométhane" à 295 m μ . 0,025.

L'excès de réactif ne peut être éliminé par le partage et on doit utiliser la séparation chromatographique dans le système "benzène-eau".

2. Etude de l'élution des hydrazones

a) étude du temps d'élution

Prises d'essai en microgrammes d'aldostérone	Densité optique corrigée à 295 m μ après des temps d'élution variable		
	1 heure	2 heures	3 heures 30 minutes
2 microgrammes	0,010	0,005	0,007
4 "	0,012	0,019	0,019
6 "	0,051	0,037	0,043
8 "	0,062	0,063	0,057

Ces résultats ne sont pas significatifs. Nous remarquons que l'élution est souvent incomplète même après 3 heures 30 minutes. En effet le papier reste coloré en jaune à l'endroit où le spot d'hydrazone a été déposé.

b) étude du mode d'élution

Le chromatogramme est séché dans un courant d'air. En général en 30 minutes on obtient un chromatogramme sec et dépourvu d'odeur benzénique.

L'élution préconisée par CHEN nous paraissant trop brutale, nous l'avons remplacée par un passage au bain-marie à des températures variables mais jamais supérieures à 70°. Nous avons étudié le temps et la température optima pour une élution complète.

L'élution (dans des tubes bouchant émeri) est complète après 30 minutes au bain-marie à une température de 70°.

3. Technique proposée

La technique originelle de CHEN peut être modifiée ainsi :

- condensation identique à celle de CHEN entre l'hydrazide salicylique et l'aldostérone.

- séparation de l'excès de réactif par une chromatographie de 60 heures dans le système "benzène-eau".

- séchage rapide du chromatogramme dans un courant d'air.

- élution du spot d'hydrazone par 2,5 cm³ d'éthanol absolu à 50 % au bain-marie à 70° pendant 30 minutes.

- refroidissement et mesure de l'absorption à 270, 295 et 320 m μ . Détermination de la densité optique corrigée à 295 m μ en appliquant la formule d'ALLEN.

4. RESULTATS obtenus avec de l'aldostérone pure

L'application de la technique précédente a permis d'obtenir la courbe d'étalonnage suivante :

Prise d'essai en microgrammes d'aldostérone	Densité optique corrigée à 295 m Séparation de l'excès de réactif par	
	60 heures de chromatographie.	72 heures de chromatographie.
2 microgrammes	0,022	0,023
4 "	0,045	0,047
8 "	0,082	0,070
10 "	0,119	0,105

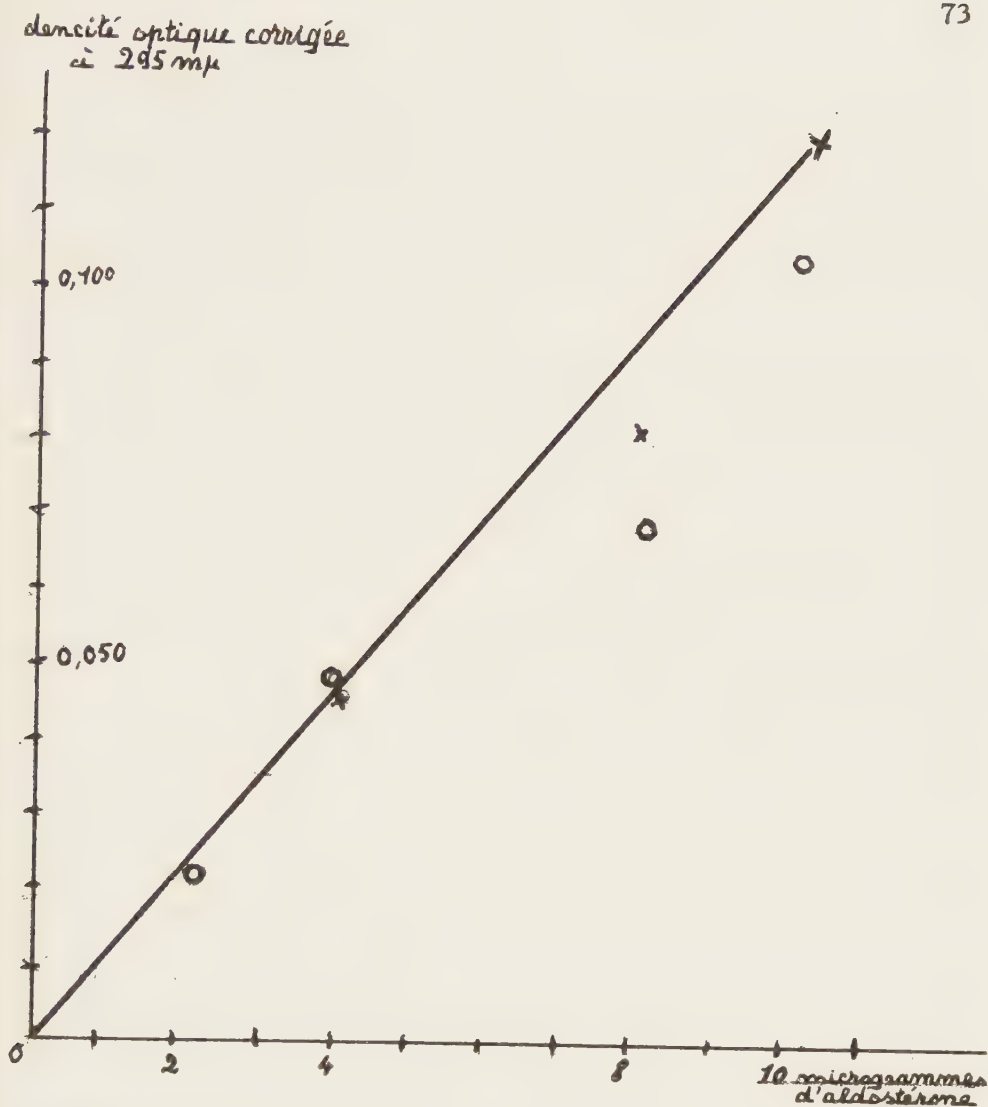


FIGURE N° 4. Courbe d'étalonnage (après 60 heures de chromatographie) - points x.
En o les points obtenus après 72 heures de chromatographie.

Après 60 heures de chromatographie, on obtient une courbe d'étalonnage correcte. La diminution importante des densités optiques, notée pour 8 et 10 microgrammes (en 72 heures) est peut-être due à une migration des hydrazones.

D) Application à la détermination de l'aldostéronurie

L'aldostérone est séparée de la cortisone par le système chromatographique "acétate de butyle-éthylène glycol-eau". La zone correspondant à l'aldostérone sur le trajet des extraits urinaires est éluee. Sur le résidu d'évaporation de l'éluat, on pratique la réaction à l'hydrazide salicylique.

Nous avons obtenu les résultats suivants comparativement à la méthode au bleu de tétrazolium (méthode visuelle).

Aldostéronurie en microgrammes par 24 heures	
Méthode à l'hydrazide salicylique	Méthode au bleu de tétrazolium.
50	36
34	50
26	4
23	4
31	32
21	5
20	8

Le tableau précédent montre une discordance importante entre les deux méthodes.

Les résultats étant superposables pour les aldostéronuries élevées et dissociés pour les faibles, il semble que l'excès de réactif plus grand dans ce dernier cas ne soit pas complètement éliminé.

E) Conclusion

Nous avons pu définir les conditions d'application de la méthode à l'hydrazide salicylique sur de l'aldostérone pure; en particulier l'élimination de l'excès de réactif et l'élution des hydrazones. Bien que ces modifications entraînent un allongement considérable de la méthode, nous avons essayé de l'appliquer aux extraits urinaires, sans obtenir de résultats valables.

Nous avons cependant respecté les conditions indiquées par CHEN: contrôle soigneux de la température de réaction et chromatographie immédiate des hydrazones après leur obtention.

§

La réaction à l'hydrazide isonicotinique

UMBERGER a décrit en 1955 l'utilisation de l'hydrazide isonicotonique (INH) comme réactif pour la détermination des Δ 4-3-cétostéroïdes. En milieu acide on obtient la formation d'hydrazones présentant une absorption maximum à 380 m μ (159).

Cette réaction a été appliquée par SMITH et FOELL (148) à la différenciation des Δ 4-3-cétostéroïdes et des Δ 1-4-3-cétostéroïdes, par CINGOLANI et coll (37) au contrôle des cétostéroïdes dans les préparations pharmaceutiques, et par WEICHSELBAUM et MARGRAF (167) à la détermination des Δ 4-3-cétostéroïdes dans le plasma.

Nous avons essayé d'appliquer cette méthode à la détermination de l'aldostéronurie.

A) Réactifs

Nous utilisons le réactif faible d'UMBERGER. Le réactif fort contenant 4 grammes % d'INH (l'INH pur nous a été fourni à titre gracieux par les laboratoires SPECIA que nous remercions ici), et 5 centimètres cubes d'acide chlorhydrique % est réservé le plus souvent à la détection des Δ 4-3 cétostéroïdes et des Δ 1,4-3 cétostéroïdes sur les chromatogrammes.

- Solution alcool-chlorhydrique : 0,625 cm³ d'acide chlorhydrique concentré-éthanol absolu q.s.p. 1000 cm³.

- Solution d'INH : 0,500 gramme d'INH pur - solution alcool-chlorhydrique précédente q.s.p. 1000 cm³.

* L'INH pur nous a été fourni à titre gracieux par les Laboratoires SPECIA que nous remercions ici.

La solution d'INH n'est pas stable contrairement à ce qu'affirment WEICHSELBAUM et coll. Nous avons pu noter en 3 à 4 jours une diminution importante de la densité optique obtenue à 380 m μ sur 10 microgrammes d'aldostérone.

	Réactif préparé le jour même	Réactif vieux de 4 jours
Densité optique à 380 m μ de l'hydrazone isonicotinique de 10 microgrammes d'aldostérone	0,113	0,090-0,083-0,090

B) Etude de la réaction sur la d-l aldostérone

1. Réaction avec l'hydrazide isonicotinique

La réaction se pratique sur une partie aliquote de la solution étalon d'aldostérone (solution éthanolique à 10 microgrammes d'aldostérone par cm³) que l'on évapore à une température voisine de 40° en s'aidant du vide.

On ajoute 2,5 cm³ de solution alcool-chlorhydrique dans un tube et 2,5 cm³ de réactif à l'INH dans un autre tube. On agite et on laisse la réaction se poursuivre une heure à la température du laboratoire. On détermine au spectrophotomètre (Graphi Spectral JOUAN) la densité optique de l'hydrazone obtenue à 380 m μ , le réactif à l'INH étant utilisé comme témoin solvant. Le zéro du spectrophotomètre est fait sur le réactif alcool-chlorhydrique.

Les densités optiques obtenues pour la solution alcool-chlorhydrique sont retranchées de celles obtenues pour le réactif à l'INH, suivant la technique de WEICHSELBAUM et MARGRAF. Mais les faibles valeurs obtenues nous donnent à penser que cette correction n'est pas nécessaire du moins lorsque l'on travaille sur un stéroïde à l'état pur (voir le tableau suivant).

* L'INH pur nous a été fourni à titre gracieux par les Laboratoires SPECIA que nous remercions ici.

Prise d'essai en microgrammes d'aldostérone	Densités optiques à 380 m μ des solutions d'aldostérone dans le réactif alcool - chlorhydrique
5 microgrammes	0,001
7,5 "	0,003
10 "	0,005

2. Spectres d'absorption de l'hydrazone isonicotinique de l'aldostérone

Le spectre d'absorption de l'hydrazone isonicotinique de 10 microgrammes d'aldostérone montre un minimum à 340 m μ et un maximum à 380 m μ .

Pour l'INH il n'y a pas de spectre mais simplement un tracé descendant à forte pente de 315 m μ à 420 m μ où la densité optique devient nulle.

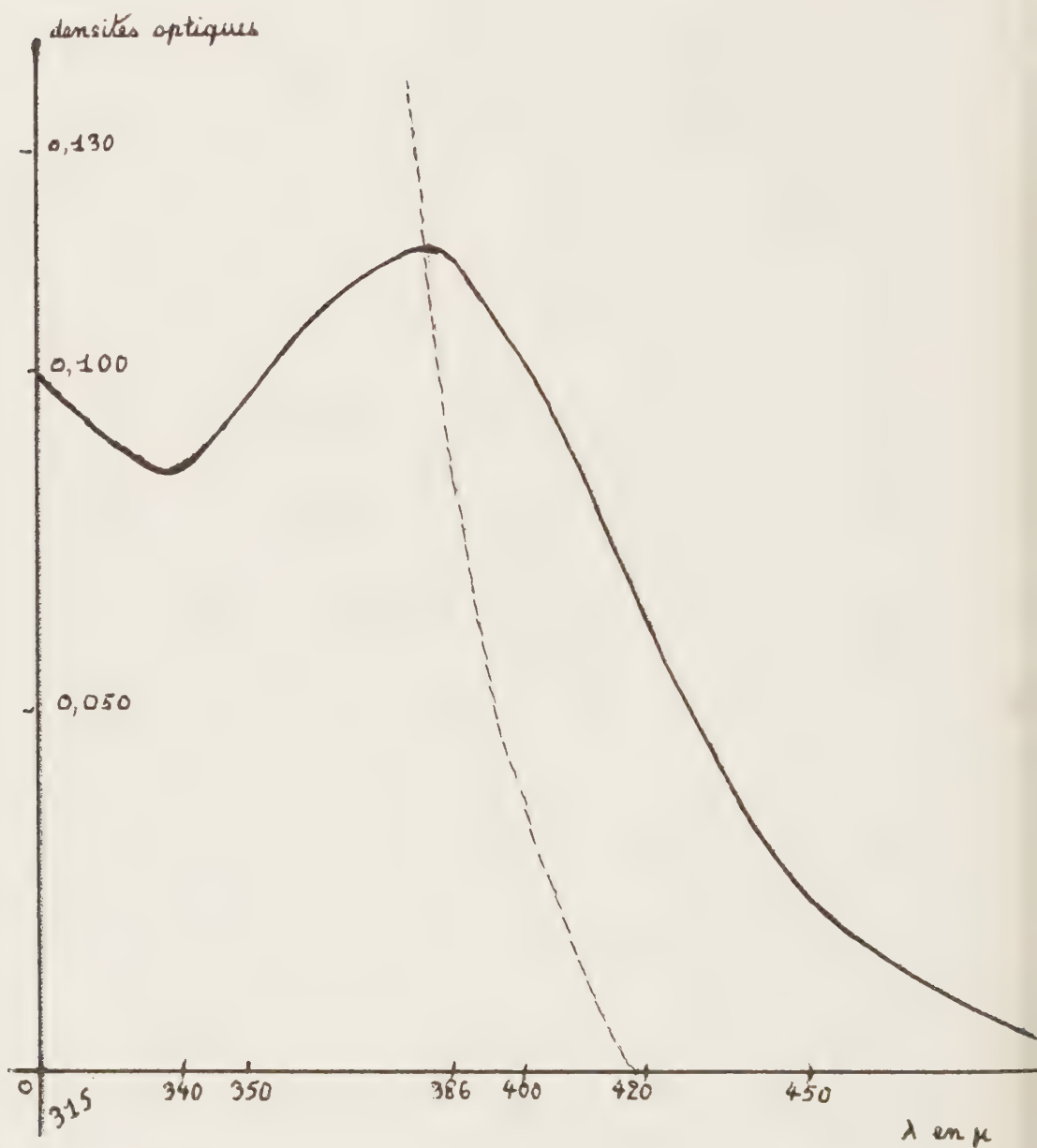


FIGURE N° 5

- Spectre de l'hydrazone isonicotinique de 10 microgrammes d'aldostérone
- - - Spectre de la solution d'INH à 0,500 gramme $^{\circ}/_{100}$

3. Courbe d'étalonnage

Suivant la technique précédente nous avons établi une courbe d'étalonnage avec des quantités d'aldostérone variant de 2,5 à 30 microgrammes.

Prise d'essai en microgrammes d'aldostérone	Densité optique moyenne à 380 m μ
2,5 microgrammes	0,029
5 "	0,060
7,5 "	0,084
10 "	0,113
15 "	0,169
20 "	0,223
30 "	0,313

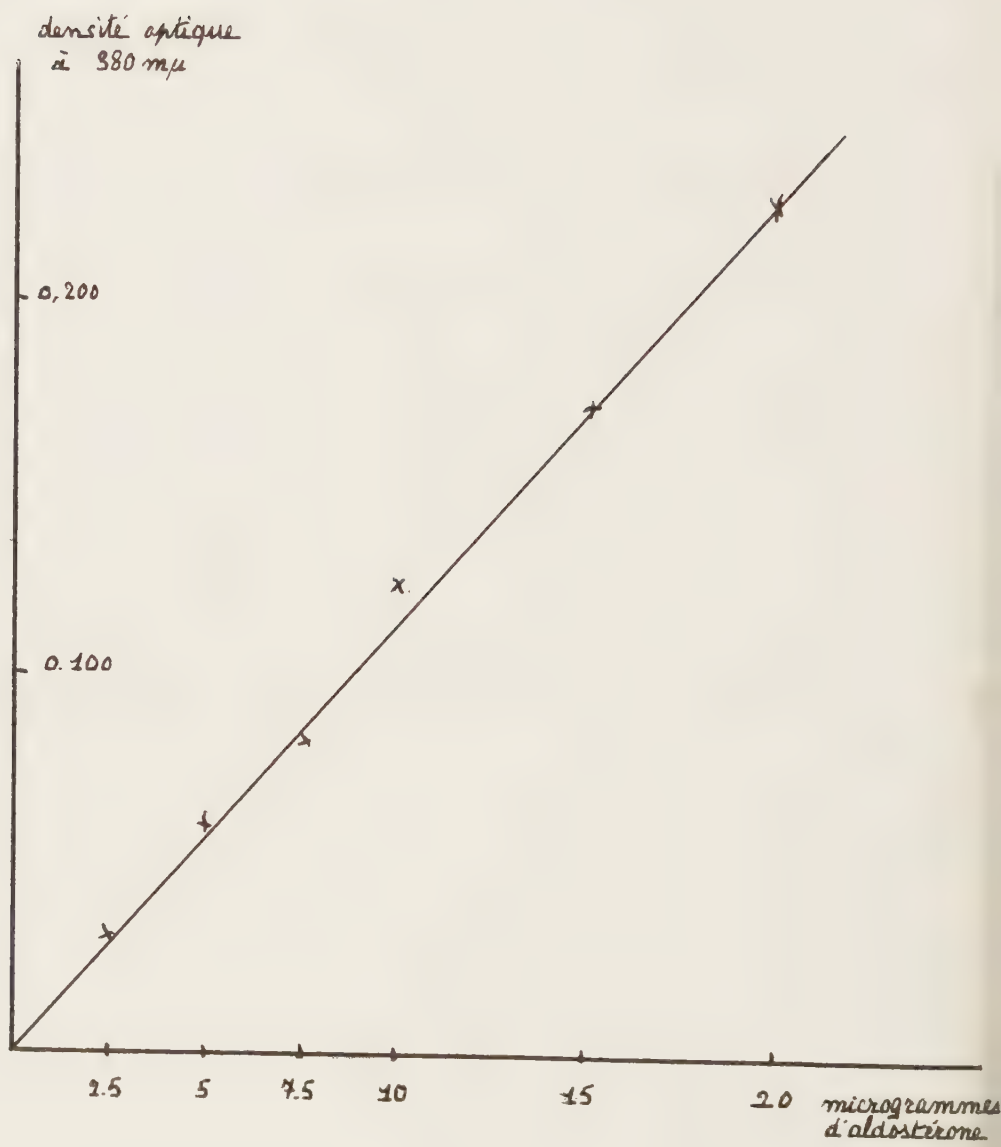


FIGURE N° 6. Courbe d'étalonnage de l'aldostérone par la réaction à l'INH

4. Conclusions

Les premiers résultats obtenus avec de l'aldostérone pure sont satisfaisants. Mais avant d'appliquer cette réaction à la détermination de l'aldostérone dans les milieux biologiques nous croyons qu'il est nécessaire d'en faire l'étude détaillée afin de déterminer les meilleures conditions opératoires.

§

C) Etude détaillée et modifications apportées à la réaction

1. Cinétique de la réaction

Elle est pratiquée sur les hydrazones isonicotiniques de 10 microgrammes d'aldostérone et de cortisone.

Les valeurs d'absorption maximum à 380 m μ des hydrazones sont atteintes en 40 minutes pour l'aldostérone et en 60 minutes pour la cortisone. Cette valeur reste constante entre 40 et 60 minutes pour l'aldostérone puis, comme pour la cortisone, on note une diminution progressive des densités optiques (figure n° 7).

Ces résultats sont un peu différents de ceux d'UMBERGER (159) et de ceux de CINGOLANI et coll (37) qui obtiennent un maximum d'absorption en 20 minutes pour la progestérone et la testostérone (UMBERGER) et pour la cortisone (CINGOLANI et coll).

2. Influence de la concentration en INH

Elle est étudiée sur l'hydrazone isonicotinique de 10 microgrammes d'aldostérone. La concentration en acide chlorhydrique reste constante : soit 0,625 cm³ %. La concentration en INH varie de 0,125 gramme % à 4 grammes % (figure n° 8).

L'absorption est maximum pour une concentration en INH de 0,250 gramme % et demeure constante jusqu'à une concentration de 0,500 gramme %. Puis on note une diminution très rapide des densités optiques.

Ceci n'est pas conforme aux travaux d'UMBERGER qui donne pour le propionate de testostérone une très légère diminution des densités optiques pour une concentration en INH variant de 0,500 à 2,5 grammes %.

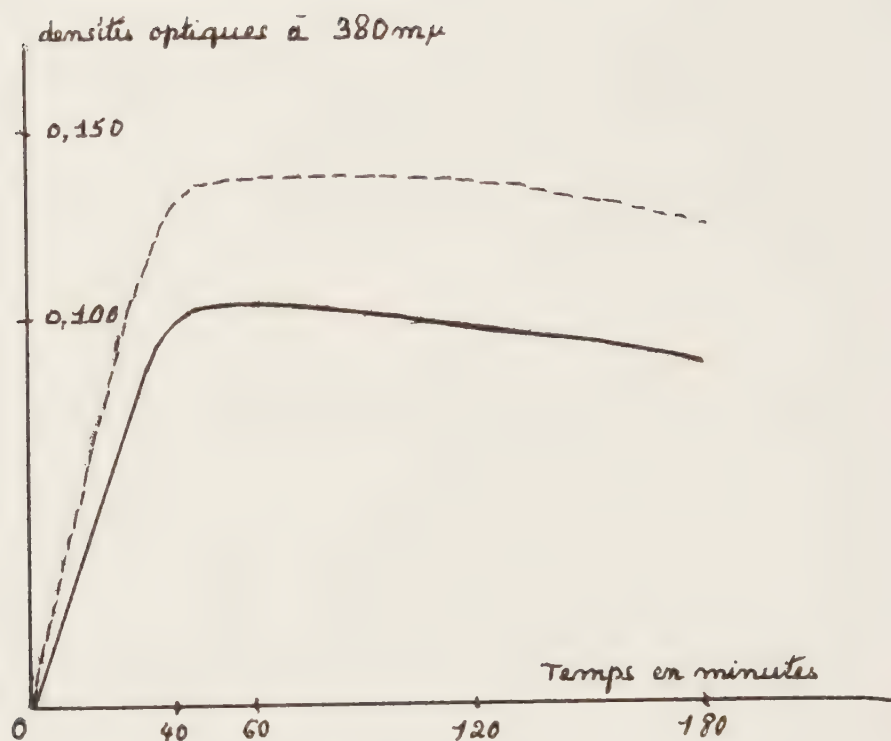


FIGURE N° 7. CINÉTIQUE DE LA RÉACTION A L'INH :

— pour l'aldostérone
 - - - pour la cortisone

3. Influence de la concentration en acide chlorhydrique

Elle est étudiée sur l'hydrazone isonicotinique de 10 microgrammes d'aldostérone. La concentration en INH reste constante : soit 0,500 gramme %, et on fait varier la concentration en acide chlorhydrique de 0,156 cm³ jusqu'à 1 cm³ %.

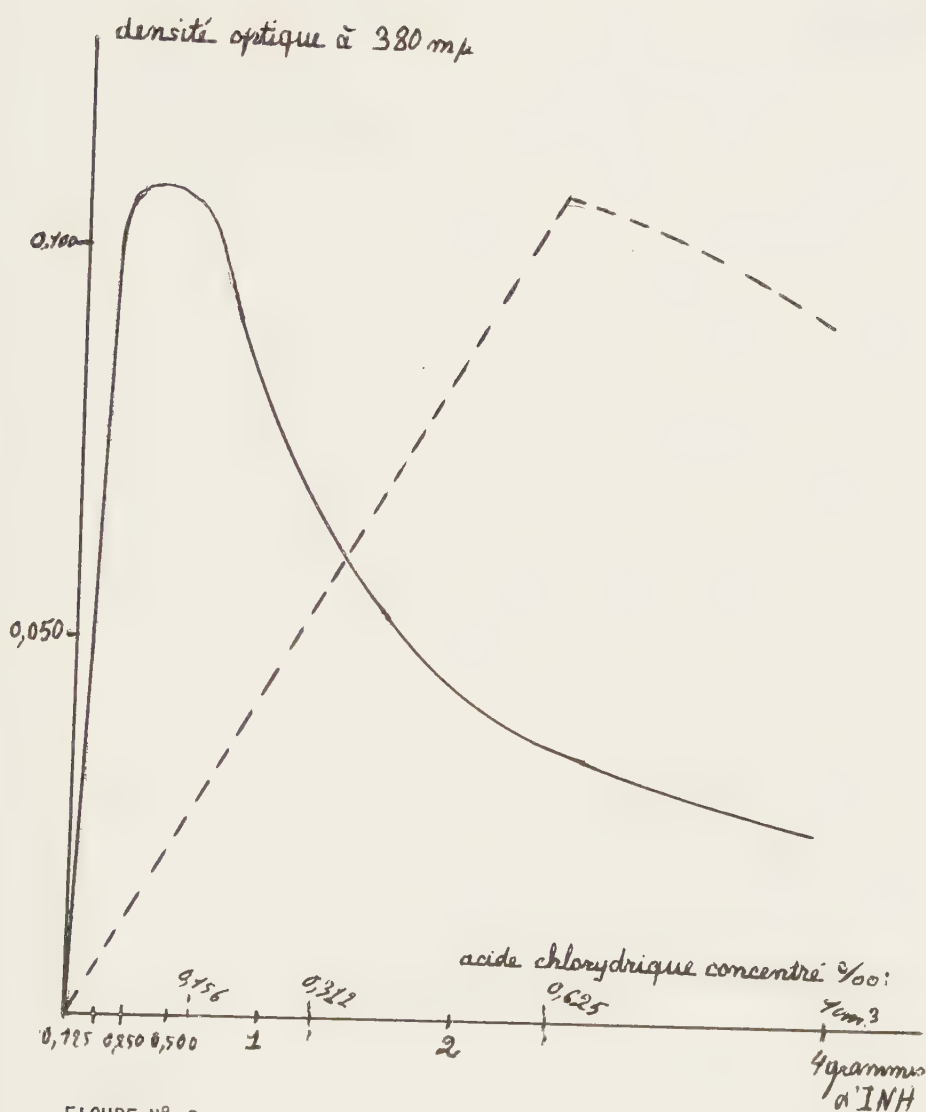


FIGURE N° 8 .

- Influence de la concentration en INH
- - - - - influence de la concentration en acide chlorhydrique concentré

Il existe une concentration optimum en acide chlorhydrique pour laquelle on observe une absorption maximum : 0,625 cm³ ‰. Puis on note une diminution des densités optiques jusqu'à 1 cm³ ‰. A partir de 4 cm³ ‰ l'INH précipite de sa solution alcoolique (figure n° 8).

Nos résultats sont en accord avec ceux donnés par UMBERGER.

4. Influence de la lumière

Alors que UMBERGER signale que la lumière n'a pas d'influence sur la réaction, CINGOLANI et coll recommandent de laisser la réaction se développer à l'obscurité.

Nous n'avons pas trouvé de différences en pratiquant la réaction selon ces deux alternatives.

§

5. Conclusion

L'étude détaillée de la réaction montre que les conditions opératoires précédemment décrites sont satisfaisantes.

On conserve donc les concentrations en INH (0,500 gramme ‰) et en acide chlorhydrique (0,625 cm³ ‰) avec un temps de réaction de 60 minutes.

§

D) Application à la détermination de l'aldostéronurie

L'aldostérone isolée par chromatographie est éluee . Sur le résidu d'évaporation de l'éluat, on pratique la réaction à l'INH. Mais les premiers résultats obtenus (tableau suivant) sur des quantités connues d'aldostérone pure éluées à partir de papier Whatman n° 1 montrent qu'il se produit probablement une réaction entre le papier et le réactif.

Prise d'essai en microgrammes d'aldostérone	Densités optiques théoriques à 380 m μ	Densités optiques après élution à 380 m μ
5 microgrammes	0,060	0,117
10	0,113	0,137
15	0,169	0,185

La réaction pratiquée sur des éluats de bandes de papier Whatman n° 1 (de même surface que celle utilisée pour l'élution de l'aldostérone) conduit aux résultats suivants :

- premier échantillon de papier :

densité optique à $380\text{ m}\mu = 0,082$.

- deuxième échantillon de papier :

densité optique à $380\text{ m}\mu = 0,061$.

Le papier donne une réaction importante avec l'INH. Elle est variable suivant l'endroit où est fait le prélèvement. Pour éviter l'interférence des débris de papier dans les dosages spectrophotométriques, les auteurs recommandent l'utilisation de papier à chromatographie lavé.

1. Etude de la purification des papier à chromatographie par lavage

Après purification on découpe des bandes de papier. Ces bandes sont éluées en chromatographie descendante. Sur l'éluat on pratique la réaction à l'INH.

a) Lavage par les solvants de la deuxième chromatographie

Il se pratique en chromatographie descendante pendant 24 heures par la phase supérieure du mélange :

- acétate de butyle	1000 cm ³ .
- éthylène glycol	50 cm ³ .
- eau	50 cm ³ .

Cette opération est inefficace et donne les mêmes résultats que précédemment.

b) Lavage par le chloroforme

Il est pratiqué comme précédemment et ne conduit à aucune amélioration.

c) Lavage par le méthanol

Cette technique est proposée par de nombreux auteurs: les papiers sont lavés au Soxhlet pendant 72 heures.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

- premier échantillon de papier :

densité optique à $380\text{ m}\mu = 0,019$.

- deuxième échantillon de papier :

densité optique à 380 m μ = 0,020.

- troisième échantillon de papier :

densité optique à 380 m μ = 0,018.

La réaction entre l'INH et le papier ne peut être supprimée complètement mais elle est uniformisée, ce qui permet l'utilisation d'un témoin papier.

d) Technique proposée

Nous avons adopté la technique suivante :

- lavage du papier par le méthanol au Soxhlet pendant 72 heures.

- témoin papier : découper avant la ligne de départ du chromatogramme une bande de papier de surface égale à celle qui supporte le stéroïde.

La réaction est pratiquée sur l'éluat du papier servant de support à l'aldostérone et sur l'éluat du témoin papier que l'on soustrait.

e) Résultats

Des quantités connues d'aldostérone pure 2,5 et 5 microgrammes sont déposées sur du papier Whatman n° 1 lavé puis sont éluées en chromatographie descendante par le mélange "méthanol chloroforme" (3:7 en volume). La réaction est pratiquée sur l'éluat.

Prise d'essai en microgrammes d'aldostérone	Densité optique théorique à 380 m μ	Densité optique après élution à 380 m μ
2,5 microgrammes	0,029	0,026
5 "	0,060	0,055

Ces résultats sont satisfaisants. Mais l'application de cette méthode à la détermination de l'aldostéronurie donne des taux sans rapport avec ceux trouvés par la méthode au bleu de tétrazolium.

Nous avons alors envisagé une autre méthode de purification.

2. Etude de la purification des extraits de papier par la méthode d'OERTEL et EIK-NES (126).

a) technique

Le résidu d'évaporation de l'éluat est repris par 15 cm³ d'acétate d'éthyle (3 fois 5 cm³) que l'on transfère dans une ampoule à décantation. On lave successivement par 10 cm³ d'une solution aqueuse d'acide sulfurique à 0,5 % puis par 10 cm³ et 5 cm³ d'eau distillée. L'acétate d'éthyle est évaporé au bain-marie à une température voisine de 40° en s'aidant du vide.

Cette purification est conduite sur l'éluat de stéroïde et sur l'éluat du témoin papier. La réaction à l'INH est pratiquée sur les résidus d'évaporation de l'acétate d'éthyle. On déduit l'absorption du papier à 380 m μ de celle notée pour le tube réaction.

b) résultats

- Pertes occasionnées par l'utilisation de cette purification : étude avec de l'aldostérone pure.

Une première série de déterminations donne des pourcentages de récupération aberrants : supérieurs à 100%. Nous avons constaté qu'il se produit une réaction entre l'acétate d'éthyle et l'INH avec formation d'un chromogène jaune absorbant à 380 m μ .

L'acétate d'éthyle est remplacé par le chloroforme Merck qui ne donne pas de réaction avec l'INH.

Le tableau suivant indique les résultats obtenus.

PRISE D'ESSAI EN MICROGRAMMES D' ADOLSTERONE	DENSITES OPTIQUES THEORIQUES (à 380 m μ)	DENSITES OPTIQUES TROUVEES (à 380 m μ)	POURCENTAGE DE RECUPERATION MOYENNE
5 microgrammes	0,060	0,043 0,046 0,048 0,050	71 % 76 % 80 % 83 % 78 %
5 microgrammes (avec extraction des eaux de lavage par le chloro- forme pour dimi- nuer les pertes.	0,060	0,048 0,044	80 % 73 % 76,5 %

Le pourcentage des pertes est important de 20 à 22 %. L'extraction par le chloroforme de l'aldostérone qui aurait pu passer dans les eaux de lavage n'améliore pas le pourcentage de récupération.

- Efficacité de cette purification.

On dépose sur du papier Whatman n° 1 (non lavé) 5 microgrammes d'aldostérone, puis on élue en chromatographie descendante par le mélange "méthanol chloroforme" (3:7 en volume). On prélève également un témoin papier. Sur les éluats on pratique la purification d'OERTEL et EIK-NES. Puis on fait la réaction à l'INH.

Prise d'essai en microgrammes d'aldostérone	Densités optiques théoriques à 380 m μ	Densités optiques trouvées à 380 m μ
5 microgrammes	0,060	0,045 0,042 0,044

La purification est efficace mais elle entraîne des pertes importantes.

- Résultats obtenus sur les extraits urinaires.

On élue la zone correspondant à l'aldostérone sur le deuxième chromatogramme ainsi qu'un témoin papier de même surface découpé avant la ligne de départ. Les éluats sont évaporés puis purifiés par la technique précédente. On pratique ensuite la réaction à l'INH.

Les résultats sont comparés à ceux obtenus par la méthode au bleu de tétrazolium (méthode par comparaison visuelle).

Aldostéronuries en microgrammes par 24 heures							
INH	BT	INH	BT	INH	BT	INH	BT
19,2	2	7,4	3	6	4	6,5	3
15,5	5	6	3	6	2	1	3
20	4	0	4	5	8	2	4
105	28	3	5	10,2	5	0	2
11	5	8	9	4,4	2	26	30
90	22	8,5	6	3	2	5,4	2
		0	3	0	3	19,5	30
		1	2	3	3	16	24
		6,4	6	3,5	5		

Les résultats obtenus par la méthode à l'INH concordent avec ceux obtenus par la méthode au bleu de tétrazolium. Nous éliminons les chiffres de la première colonne que nous discuterons dans la dernière partie.

Pour les aldostéronuries normales (soit de 2 à 10 microgrammes par 24 heures) les résultats donnés par l'INH sont soit en excès, soit en défaut. Nous attribuons cette variation au manque de précision lors de l'évaluation des taches colorées après pulvérisation du chromatogramme au bleu de tétrazolium. Cette dissociation n'a que peu d'importance au point de vue biologique.

§

E) Conclusions

La formation d'hydrazone isonicotinique de l'aldostérone suivant le mode opératoire décrit par UMBERGER est facile à réaliser sur de l'aldostérone pure. La détermination de l'aldostérone dans les extraits urinaires nécessite l'utilisation de purifications supplémentaires (l'INH donne en effet des réactions parasites avec le papier à chromatographie). La purification des extraits de papier par la méthode d'OERTEL et EIK-NES est efficace mais entraîne une augmentation importante des pertes.

L'étude détaillée de trois réactions applicables au dosage de l'aldostérone nous permet de penser que la réaction au bleu de tétrazolium et la réaction à l'hydrazide isonicotinique peuvent être utilisées avec succès à la détermination de l'aldostéronurie. Par contre l'impossibilité d'éliminer totalement l'excès de réactif dans la réaction à l'hydrazide salicylique, nous fait abandonner cette technique.

QUATRIEME PARTIE

I. DISCUSSION DES TECHNIQUES ETUDIEES

1. Extraction, purification et séparation de l'aldostérone

Le taux extrêmement bas de l'aldostéronurie oblige à pratiquer l'extraction sur des quantités importantes d'urine, le plus souvent la demi-diurèse de 24 heures. Dans ces conditions les impuretés extraites en même temps que les stéroïdes sont nombreuses et l'on doit avoir recours à des méthodes de purification efficaces.

On élimine la majeure partie des pigments urinaires par les lavages aux alcalins et surtout par le partage entre méthanol-eau et éther de pétrole-toluène. La chromatographie d'adsorption sur florisil est surtout intéressante pour éliminer les stéroïdes peu polaires. Il est important (et nous l'avons vérifié) d'utiliser un florisil parfaitement réactivé sous peine de voir son pouvoir adsorbant se modifier, ce qui entraîne des variations notables dans le pourcentage de récupération de l'aldostérone. L'utilisation successive de ces trois techniques ne s'est pas toujours révélée assez efficace et nous avons obtenu souvent des extraits très colorés et d'aspect huileux. Il ne paraît guère souhaitable d'appliquer d'autres techniques de purification sous peine d'augmenter les pertes en aldostérone.

Pour cette raison la première séparation chromatographique se fait dans un système possédant une forte capacité de charge, tels les systèmes de ZAFFARONI.

Nous n'avons étudié que le système "toluène propylène-glycol", recommandé par NEHER et WETTSTEIN pour les extraits très contaminés à cause de son important pouvoir de séparation (112). La reproductibilité des systèmes de type ZAFFARONI est fonction de l'imprégnation correcte du papier par la phase stationnaire : dans ce cas le propylène-glycol.

On utilise une solution de propylène-glycol à 50 % dans le méthanol. Cette solution doit être préparée extemporanément ou conservée au réfrigérateur pour éviter l'évaporation du méthanol ce qui en fausserait le titre. En effet l'influence de la concentration en propylène-glycol de la solution sur la migration a été étudiée par

ZAFFARONI (177). Cet auteur recommande de ne pas utiliser une solution de concentration inférieure à 50 % car on diminue le pouvoir de séparation du système chromatographique et les spots ont tendance à diffuser; ni une solution supérieure à 50 %, ce qui augmente trop la polarité du système. Il faut également fixer la quantité de phase stationnaire utilisée pour un chromatogramme de dimensions données : pour une feuille de 12 x 43 centimètres nous utilisons 40 centimètres cubes de solution au $\frac{1}{2}$ de propylène-glycol.

Le chromatogramme est imprégné par passage d'un mouvement lent et régulier dans la solution. Puis on l'essore entre deux feuilles de papier filtre pour éliminer l'excès de phase stationnaire. Les extraits urinaires doivent alors être posés dans un temps relativement court, n'excédant pas 20 minutes, de manière à éviter l'évaporation de la phase stationnaire et la fixation d'humidité sur le chromatogramme, ce qui modifierait la migration.

Les temps de migration nécessaires pour assurer une bonne séparation sont longs : 48 heures. Il n'est pas possible de les abaisser par exemple en diminuant la polarité de la phase stationnaire car, nous l'avons vu précédemment, on diminue le pouvoir de séparation. L'utilisation de systèmes plus rapides (exemple le système chloroforme-formamide) n'est pas à conseiller car dans le cas d'extraits très contaminés la rapidité de la migration se fait au détriment de l'élimination des impuretés.

L'inconvénient majeur du système "toluène propylène-glycol" réside dans la difficulté d'élimination de la phase polaire qui imprègne le papier. Les chromatogrammes sont très longs à sécher (24 heures environ) et les éluats de papier donnent presque toujours par évaporation des résidus huileux, difficiles à éliminer. NEHER et WEITSTEIN (cités dans 81) proposent de sécher le chromatogramme à l'air chaud, d'éluer le spot, d'étendre l'éluat avec de l'eau et d'extraire l'aldostérone par le chloroforme. Le chloroforme est évaporé, le résidu repris par l'acétone et on ne garde que la fraction acétono-soluble. Nous n'avons pas utilisé cette technique. Un séchage prolongé du chromatogramme (24 heures ou plus à la température ordinaire et à l'abri de la lumière) s'est presque toujours avéré suffisant.

En nous basant sur les extraits que nous avons eus à chromatographier, nous pensons que le système "toluène (1) à la température ordinaire"

propylène-glycol" est très intéressant car il réalise à la fois une bonne séparation de l'aldostérone et de l'hydrocortisone et une purification de l'extrait par entraînement d'une grande partie des impuretés.

Il serait avantageux de pratiquer la deuxième chromatographie dans un système de type BUSH, surtout lorsque l'on veut réaliser ultérieurement un dosage spectrophotométrique de l'aldostérone après élution. Mais le réglage minutieux de la température pendant l'équilibration et la migration nécessite un appareillage spécial : étuve à chromatographie ou pièce thermostatisée. Cet inconvénient nous a fait abandonner le système "E2B".

Les systèmes de DI PERRI et coll (44), systèmes de BUSH inversés, se pratiquent à la température ordinaire. Ils ne nous ont pas donné de résultats.

Le système de MATTOX et LEWBART (103) "éthylène glycol, acétate de butyl, eau" est intéressant par sa rapidité (6 heures) et par la nature de sa phase stationnaire "l'éthylène glycol" qui ne perturbe pas les réactions colorées des stéroïdes (130-150). Les conditions opératoires décrites pour le système "toluène propylène glycol" sont valables. Nous utilisons pour l'imprégnation du chromatogramme 40 cm³ d'une solution à 40 % d'éthylène glycol dans l'acétone. Les inconvénients sont les mêmes que pour le système "toluène propylène glycol" : lenteur de séchage du chromatogramme et résidus huileux, cependant plus faciles à éliminer. Nous avons noté des effets de déplacement importants; pour bien fixer la position des stéroïdes nous ajoutons de la cortisone aux extraits urinaires. Mais la séparation de l'aldostérone et de la cortisone se fait d'une manière très efficace.

L'aldostérone repérée aux UV à 240 m μ est éluee en chromatographie descendante par le mélange "chloroforme-méthanol" (7:3) qui sert de phase saturante et éluante. Nous avons vérifié que l'élution est complète en 24 heures.

Cette technique nous a paru la plus satisfaisante. Elle n'entraîne qu'un minimum de débris de papier, contrairement à celles qui consistent à extraire le stéroïde à partir du papier coupé en morceaux.

2. Détermination quantitative

L'absence de réaction spécifique de caractérisation pour l'aldostérone oblige à utiliser plusieurs méthodes d'identification et de dosage. Nous pensons que les dosages basés sur la caractérisation des 2 principales fonctions de l'aldostérone (chaîne latérale α céto et groupement Δ 4-3-céto) et son comportement chromatographique suffisent pour assurer son identification. Les faibles taux urinaires interdisent l'emploi des spectres d'absorption dans l'infra-rouge ou même dans les acides sulfurique ou phosphorique.

a) dosage par caractérisation de la chaîne latérale α céto

Nous avons étudié la réduction du bleu de tétrazolum en milieu alcalin directement sur le chromatogramme.

Le dosage par comparaison visuelle avec des spots témoins d'aldostérone (5 et 10 microgrammes) est assez délicat et est souvent fonction de l'entraînement de l'observateur. Il est nécessaire d'apprécier à la fois la surface et l'intensité de la tache colorée.

Cependant cette méthode est facile à réaliser et conduit à de bons résultats.

b) dosage par caractérisation du groupement Δ 4-3-céto.

Le repérage préalable des stéroïdes sur le chromatogramme permet d'affirmer qu'il s'agit bien d'un composé porteur d'un groupement Δ 4-3-céto (fluorescence bleue violacée en lumière ultra-violette à 240 m μ).

La formation d'hydrazone salicylique de l'aldostérone suivant la technique de CHEN (36) ne nous a pas conduit à des résultats satisfaisants sur de l'aldostérone pure. Mais l'étude détaillée des conditions opératoires (temps et mode d'élution ainsi que séparation de l'excès de réactif) conduit à une technique longue mais qui donne des résultats valables sur de l'aldostérone pure. Son application aux extraits urinaires s'est révélée impraticable, probablement par suite de la présence d'un excès d'hydrazide salicylique impossible à éliminer. L'hydrazide salicylique possède un spectre d'absorption identique à celui de l'hydrazone salicylique de l'aldostérone, avec un maximum très intense à 295 m μ (à cette longueur d'onde, la quantité d'hydrazide salicylique requise pour la réaction

tion possède une densité optique si élevée qu'elle n'est pas mesurable). Cela empêche d'utiliser le réactif comme blanc au spectrophotomètre.

Le dosage de l'aldostérone par cette méthode doit donc obligatoirement comporter une séparation de l'excès de réactif. Comme nous n'avons pas pu la réaliser sur les extraits urinaires, nous avons dû abandonner cette technique.

La formation d'hydrazone isonicotinique de l'aldostérone s'est révélée intéressante. L'étude détaillée de la réaction nous a montré que l'aldostérone réagissait comme les autres $\Delta 4-3$ -céto étudiés par UMBERGER et par CINGOLANI. Les conditions opératoires données par UMBERGER (concentration en hydrazide isonicotinique et en acide chlorhydrique) sont valables pour l'aldostérone. La réaction est moins rapide : l'absorption est maximum en 40 minutes seulement.

L'application de cette réaction à la détermination de l'aldostéronurie nécessite l'utilisation de purifications supplémentaires car nous avons pu vérifier que le réactif réagissait avec un grand nombre d'impuretés, avec le papier à chromatographie et certains solvants. Le lavage des papiers par le méthanol au Soxhlet s'étant révélé inefficace, nous avons dû faire appel à la technique d'OERTEL et EIK-NES pour la purification des extraits de papier. Dans presque tous les cas nous avons obtenu des éluats suffisamment purifiés pour conduire à des résultats corrects. Mais le pourcentage des pertes est très augmenté.

L'aldostérone isolée après la mise en oeuvre de longs procédés d'extraction et d'isolement peut être identifiée avec assez de certitude par sa position sur les chromatogrammes et par une seule réaction. Cependant l'absence de spécificité de ces réactions (le bleu de tétrazolium est réduit non seulement par tous les stéroïdes porteurs d'une chaîne latérale α cétolique, mais aussi sous certaines conditions par des stéroïdes porteurs du groupement $\Delta 4-3$ -céto et même par des substances non stéroliques — l'hydrazide isonicotinique réagit avec les $\Delta 4-3$ -céto et les $\Delta 1,4-3$ -cétostéroïdes) oblige à être très prudent dans l'interprétation des résultats. Nous croyons qu'il est alors nécessaire de caractériser les deux groupements fondamentaux de la molécule : la chaîne latérale α cétolique et le groupement $\Delta 4-3$ -céto.

Pour cette raison nous retenons la méthode au bleu de tétrazolium et la méthode à l'hydrazide isonicotinique pour le dosage de l'aldostérone urinaire.

§

3. Etude des pertes en aldostérone au cours des différentes opérations

Nous avons réalisé cette étude à chaque étape du dosage, avec des quantités connues d'aldostérone pure (10 microgrammes).

Pendant l'extraction et les premières purifications de l'extrait chloroformique par les alcalins, nous avons noté 20 % de pertes. Elles sont dues en partie à une solubilisation de l'aldostérone dans les solvants de lavage (alcalins et eau distillée). On pourrait, comme le font la plupart des auteurs, diminuer les pertes en pratiquant une extraction des eaux de lavage. Nous ne l'avons pas fait de peur de solubiliser une quantité importante de chromogènes urinaires qui gênent lors des séparations chromatographiques.

La chromatographie d'adsorption sur florisil amène 10 % de pertes. Mais l'utilisation d'autres adsorbants (gel de silice) n'est pas indiquée car ils retiennent davantage les stéroïdes polaires.

Enfin le partage entre "méthanol-eau" et "éther de pétrole-toluène" donne 10 % de pertes, tandis que l'élution par le mélange "chloroforme-méthanol" en chromatographie descendante est presque quantitative (3 % de pertes).

La purification d'OERTEL et EIK-NES donne 20 % de pertes. L'extraction de l'aldostérone qui aurait pu passer dans les eaux de lavage s'est révélée sans action sur le taux de récupération.

Les pourcentages globaux de récupération peuvent alors être calculés ainsi :

- Taux de départ		100 %
- Pertes au cours de l'extraction et des premières purifications	20 %	80 %
- Pertes au cours de la chromatographie sur florisil	10 %	72 %

- Pertes au cours du partage entre solvants	10 %	64,8 %
- Pertes au cours de l'élution du premier chromatogramme	3 %	62,8 %
- Pertes au cours de l'élution du deuxième chromatogramme	3 %	61 %
- Pertes au cours de la purification d'OERTEL et EIK-NES	20 %	48,8 %

soit un pourcentage de récupération égal à 62,8 % par la méthode au bleu de tétrazolium et à 48,8 % par la méthode à l'hydrazide isonicotinique.

Le pourcentage de récupération par la méthode au bleu de tétrazolium est un peu inférieur à celui obtenu par la plupart des auteurs :

NOWACZINSKI et coll	(122)	83 %
SOHEL	(149)	74 %
CHEN	(36)	74-86 %
DYRENFURTH	(43)	60-65 %
STAUB, DINGMAN	(151)	80,5 %.

Cette différence provient probablement du fait que nous utilisons deux méthodes de purification des extraits urinaires : chromatographie d'adsorption sur florisil suivie d'un partage entre deux solvants. Mais il n'est pas possible de supprimer l'une d'elles sous peine d'obtenir des extraits très impurs impossibles à analyser par chromatographie sur papier. La différence obtenue dans les pourcentages de récupération entre la méthode au bleu de tétrazolium et la méthode à l'hydrazide isonicotinique est liée à l'utilisation dans ces dernières d'une technique supplémentaire de purification : la purification des extraits de papier suivant la technique d'OERTEL et EIK-NES.

II. RESULTATS OBTENUS DANS LES DOSAGES URINAIRES

1. Etude statistique des résultats

Cette étude n'a pu être réalisée que sur les résultats fournis par la méthode au bleu de tétrazolium (394 dosages). Le petit nombre de résultats donnés par la méthode à l'INH nous empêche de tirer des conclusions (26 dosages).



FIGURE N° 9: COURBE DE REPARTITION STATISTIQUE DES TAUX D'ALDOSTERONE MESURES PAR LA REACTION AU BLEU DE TETRAZOLINE

L'examen de la courbe de répartition statistique des résultats (figure n° 9) montre que la majorité des résultats (291 dosages, soit 73,6 %) se répartit entre 0 et 7 microgrammes par 24 heures.

La moyenne arithmétique de ces 291 dosages est $m=3,7$ microgrammes par 24 heures. L'écart standard (variance) est $s = 1,65$.

En appliquant les lois de la distribution statistique normale on prévoit que 95,5 % des résultats seront entre 0,4 et 7 microgrammes par 24 heures ($m-2s$ et $m+2s$), et 68 % des résultats entre 2 et 5,3 microgrammes par 24 heures ($m-s$ et $m+s$).

En fait nous avons 100 % des résultats entre 0 et 7 microgrammes par 24 heures, et 78,6 % des résultats entre 2 et 6 microgrammes par 24 heures.

Notre courbe de répartition étant en accord avec les prévisions de la statistique, nous pouvons définir le taux statistique normal de l'aldostéronurie mesurée par la méthode au bleu de tétrazolium : de 2 à 5,3 microgrammes par 24 heures. La connaissance du pourcentage de pertes amenées par les opérations supplémentaires dans la méthode à l'INH nous permet de penser que les taux normaux par cette méthode s'étagent de 1,50 microgrammes à 4,10 microgrammes par 24 heures.

§

Ce taux se trouve dans les limites données par les auteurs, quoique un peu plus faible.

Auteurs	Aldostéronurie en microgrammes par 24 heures
NEHER et WETTSTEIN (113)	1,5 à 8
NOWACZINSKI, KOIW et GENEST (124)	2,2 à 10
MOOLENAR (105)	10
SOBEL et coll (149)	2 à 15
BAULIEU et coll (12)	5 à 6
ROMANI (134)	2,2 à 10,4
STAUB et DINGMAN (151)	3 à 16

2. Les chiffres pathologiques

Les limites du taux normal d'aldostéronurie ne doivent pas être regardées comme très strictes et il semble que l'on ne peut parler d'hyperaldostéronurie qu'à partir de 15 microgrammes par 24 heures.

Nous allons présenter dans les tableaux suivants quelques résultats obtenus chez des malades porteurs d'œdèmes d'origine hépatique ou rénale.

L'aldostéronurie a été dosée par la méthode au bleu de tétrazolium (les chiffres entre parenthèses sont donnés par la méthode à l'INH). Le sodium urinaire a été dosé par photométrie de flamme.

Cirrhoses alcooliques ascitiques

Malades	Aldostéronurie en microgrammes par 24 heures		Sodium urinaire en mEq par 24 heures	
G...	30		133	
M...	2(3)	28	175	297
B...	51		26	
P...	9	35		250
M...	32		27	
C...	40	30(26)		120
C...	5		51	
T...	2		90	
B...	16		174	
G...	4		60	
A...	14		20	
B...	5(3,4)		6	

Néphroses

Malades	Aldostéronurie en microgrammes par 24 heures	Sodium urinaire en mEq par 24 heures
D...	30(20)	
	22	16
	24(16,2)	383
	4	172
G...	5	2,6
P...	11	83
M...	5	2
	9	1
	10	1
P...	125	

Les résultats sont très dissociés : l'hyperaldostéronurie n'est pas constante. Mais nous avons déjà vu que l'aldostéronurie n'est pas obligatoirement le reflet de la sécrétion d'aldostérone (98). Certains de ces malades sont traités par des spiro lactones. Presque tous réagissent bien : malade M... (cirrhose) dont l'aldostéronurie passe de 2 à 28 microgrammes par 24 heures, la natriurie passant de 175 mEq à 297 mEq par 24 heures.

* * *

III. ETUDE DES CAUSES D'ERREUR DANS LA DETERMINATION DE L'ALDOSTERONURIE

Nous étudierons dans ce chapitre les causes d'erreur rencontrées au cours de nos dosages et nous signalerons la présence de composés non identifiés sur les chromatogrammes.

1. Composés non identifiés sur les chromatogrammes

Nous avons détecté (aux UV à 240 m μ) une dizaine de fois environ dans le système "acétate de butyle éthylène glycol eau" un composé migrant au niveau de l'aldostérone, le plus souvent non réducteur vis-à-vis du bleu de tétrazolum.

Dans un cas, la détermination de l'aldostéronurie par la méthode au bleu de tétrazolum et par l'INH a montré des résultats très dissociés BT 2 microgrammes par 24 heures et INH 19,2 microgrammes par 24 heures. Nous pensons que l'on peut peut-être rattacher ce corps ($\Delta 4-3$ -cét α , sans chaîne latérale α céto-lique) au composé V de GENEST qui migre au niveau de la cortisone dans le système "toluène propylène glycol". Mais nous ne l'avons pas vérifié.

Dans le même système de MATTOX et LEWBART nous avons rencontré des composés migrant près de la ligne de départ (figure n° 2) à réaction positive ou négative avec le bleu de tétrazolum. Nous ne les avons pas identifiés.

2. Causes d'erreur

L'étude des causes d'erreur est surtout intéressante dans la méthode à l'INH.

a) chromogènes urinaires

La purification des extraits de papier suivant la technique d'OERTEL et EIK-NES supprime presque toujours les contaminations par les chromogènes urinaires. Cependant nous avons obtenu en présence d'un résidu d'évaporation d'éluat jaune la dissociation suivante :

- 105
- méthode au BT : 4 microgrammes par 24 heures.
 - méthode à l'INH : 20 microgrammes par 24 heures.

b) Aldactone

Le point de départ de la recherche de cette cause d'erreur a été l'observation des différences très importantes que nous avons obtenues dans quelques dosages.

Malade	Aldostéronurie en microgrammes par 24 heures	
	BT.	INH.
G...	4	20
M...	28	105
D...	22	90
C...	5	11

Ces malades ~~étaient~~ traités par l'aldactone stéroïde de synthèse possédant un groupement $\Delta 4-3$ -céto sans chaîne latérale α cétoïque. Il donne donc une réaction positive à l'INH et une réaction négative au BT.

Réactions analytiques de l'aldactone

Ce corps est soluble dans le chloroforme et sera donc extrait de l'urine en même temps que l'aldostérone.

Le spectre de la réaction à l'INH montre un maximum à 380 m μ puis une courbe rapidement descendante jusqu'à 500 m μ où la densité optique est nulle (figure n° 10).

Le spectre d'absorption dans l'acide sulfurique peut servir à son identification.

On ajoute 3 cm³ d'acide sulfurique Merck au résidu d'évaporation d'une prise d'essai, correspondant à 50 microgrammes d'aldactone. On laisse la réaction se développer 2 heures à la température du laboratoire et à l'obscurité.

On obtient un chromogène de coloration rose orangée dont le spectre montre les caractéristiques suivantes :

* L'aldactone pure nous a été fournie à titre gracieux par les Laboratoires BYLA, que nous remercions ici.

- quatre petits maximums à 225, 260, 285 et 420 m μ
- deux grands maximums à 350 et 500 m μ (figure n° 11).

Comportement chromatographique

Dans le système "acétate de butyle-éthylène glycol-eau" l'aldactone parcourt en 4 heures 30 minutes une distance de 25 cm (l'aldostérone et la cortisone parcourent respectivement 7,3 et 15,3 cm). L'aldactone ne migre donc pas au niveau de l'aldostérone à l'état pur. Mais en réalité les dosages de l'aldostérone sont perturbés non par l'aldactone, mais par ses métabolites urinaires.

Etudes des extraits urinaires des malades traités par l'aldactone (les malades reçoivent 400 mg d'Aldactone par 24 heures).

Nous avons vérifié si les urines avaient été collectées pendant le traitement. C'est le cas pour les malades G... , M... et D... chez lesquels la dissociation est la plus importante. Pour le malade C... où la dissociation est plus faible, les urines ont été recueillies 3 jours après l'arrêt du traitement.

D'autres dosages ont été pratiqués chez ces mêmes malades avant et après le traitement. Seuls les dosages pratiqués pendant le traitement sont perturbés, ce qui apporte un argument supplémentaire en faveur d'une interférence de l'aldactone.

- Sur les chromatogrammes provenant d'une migration dans le système "toluène propylène glycol" on note en lumière UV à 240 m μ des spots très importants au niveau de la cortisone et de l'hydrocortisone. Ces spots sont accompagnés de traînées entre la cortisone et l'hydrocortisone ainsi qu'au-delà de la cortisone.

La zone correspondant à la cortisone ayant été découpée pour les dosages, nous avons réalisé les spectres sulfuriques sur les éluats des spots migrant au niveau de l'hydrocortisone et entre la cortisone et l'hydrocortisone. Nous avons obtenu des chromogènes de coloration vieux rose ou rose saumon.

Pour tous les malades (sauf le malade G...) ces spectres montrent des pics importants à 350 et 500 m μ et des petits maximums à 295 et 420 m μ (figure n° 11).

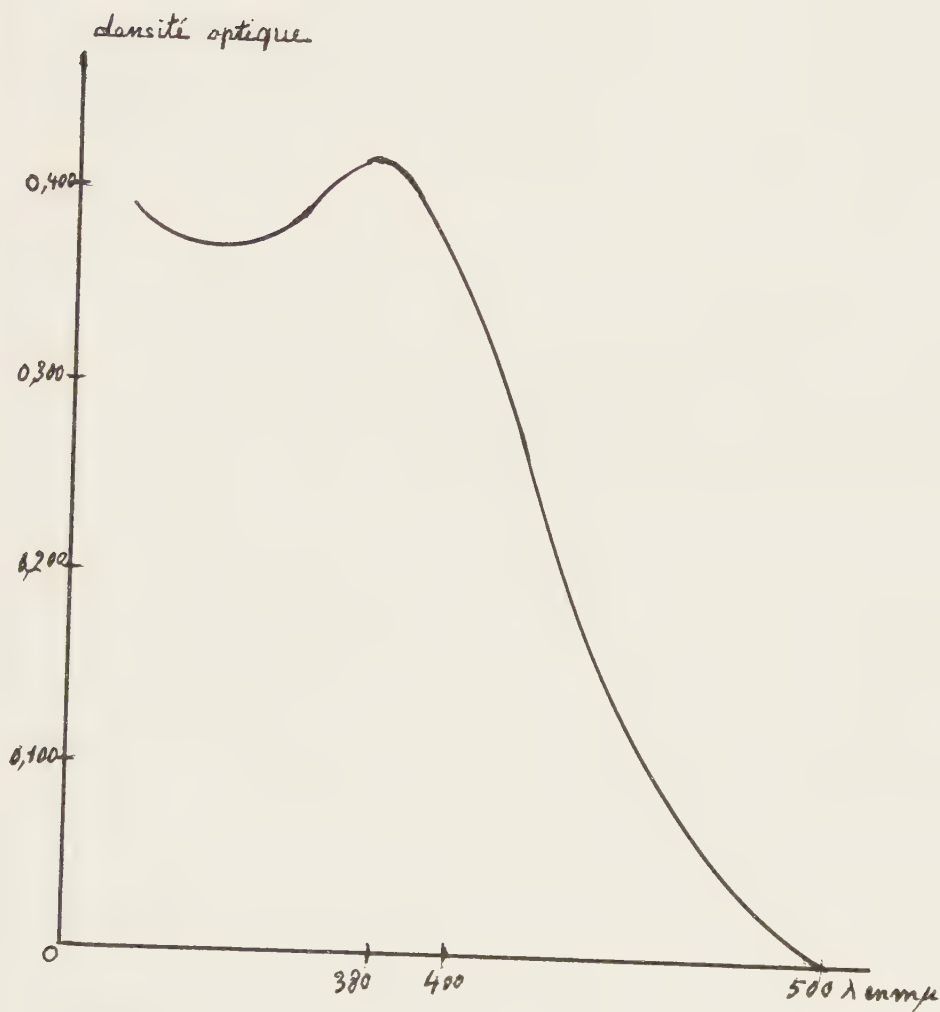


FIGURE N° 10. Spectre d'absorption de l'hydrazone isonicotinique de 50 microgrammes d'aldactone.

- Puis nous avons chromatographié les éluats des spots migrant entre la cortisone et l'hydrocortisone dans le système "acétate de butyle-éthylène glycol-eau".

Pour tous les malades (sauf le malade G...) on obtient des spots BT négatif et INH positif au niveau de l'aldostérone. La détection des spots se fait par pulvérisation d'une solution méthanolique d'INH (4 grammes %) et d'acide chlorhydrique (5 cm³ %) ; puis après séchage par pulvérisation d'une solution de BT.

§

Conclusion

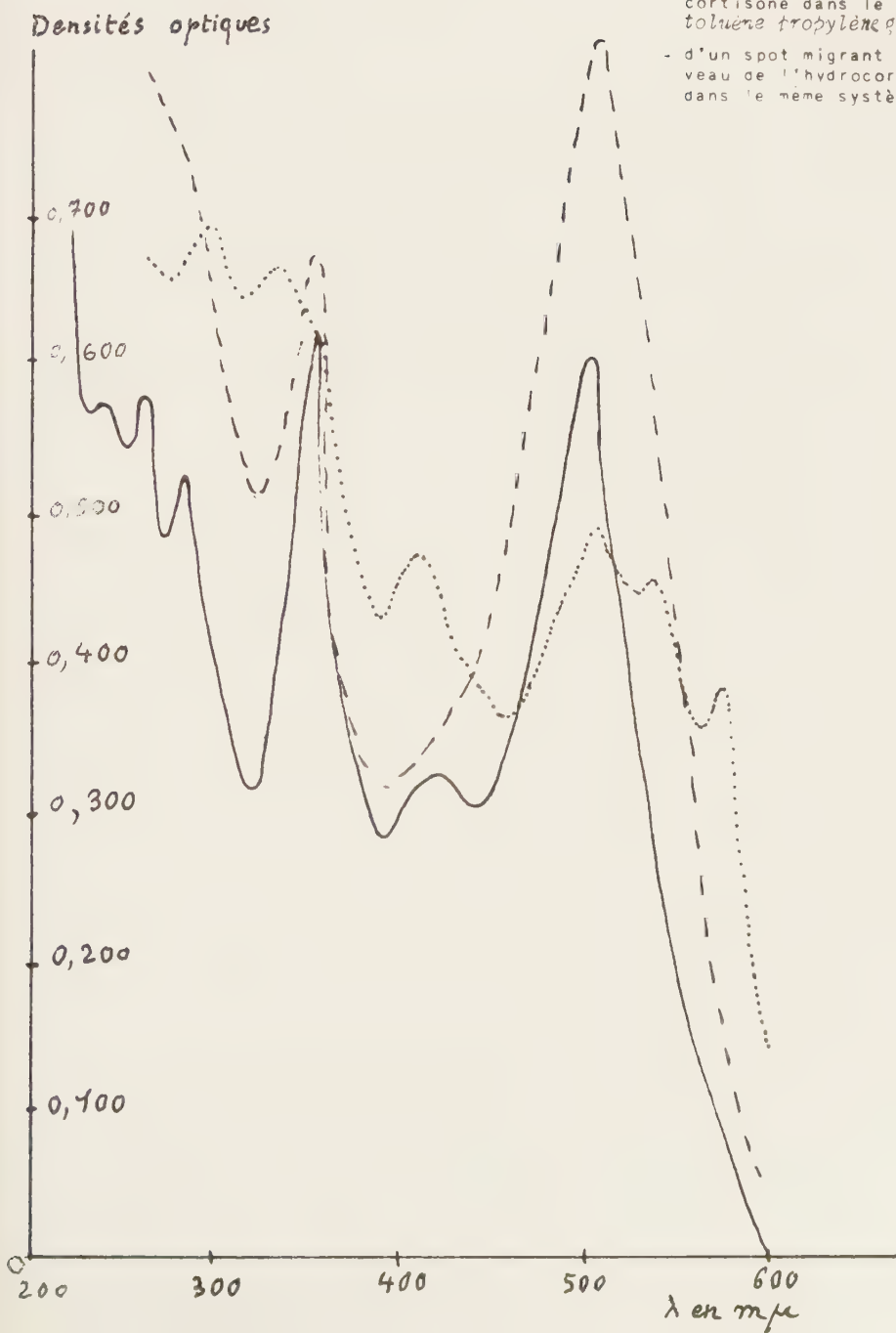
Il semble bien que les spots retrouvés dans le système "toluène propylène glycol" au niveau de la cortisone, de l'hydrocortisone et entre les deux soient liés à la thérapeutique par l'aldactone. Les spectres d'absorption dans l'acide sulfurique permettent de le penser.

Le comportement chromatographique de l'aldactone pure est difficile à préciser. Le fait important est que l'on retrouve de l'aldactone ou ses métabolites au niveau de la cortisone dans le système "toluène propylène glycol". Nous avons vu que ces spots chromatographiés dans le système "acétate de butyle éthylène glycol eau" migrent au niveau de l'aldostérone et donnent une réaction positive avec l'INH mais négative avec le BT : d'où la dissociation que nous avons relevée dans nos dosages.

FIGURE N° 11

Spectre d'absorption dans
l'acide sulfurique

- de 50 microgrammes d'al-
dactone;
- d'un spot migrant entre
la cortisone et l'hydro-
cortisone dans le système
toluène propylène glycol.
- d'un spot migrant au ni-
veau de l'hydrocortisone
dans le même système.



IV. METHODE PROPOSEE

I. REACTIFS

- Acide chlorhydrique concentré RP
- Acide sulfurique concentré RP
- Soude N et 0,1 N
- Chlorure de sodium RP
- Sulfate de sodium RP
- Florisil (réactivé par chauffage à 600° pendant 4 heures)
- Papier à chromatographie Whatman n° 1
- Solvants : (tous les solvants utilisés sont des solvants RP)
 - o Acétate d'éthyle
 - o Acétone
 - o Chloroforme (RP et Merck)
 - o Ethanol absolu
 - o Ether de pétrole
 - o Ethylène glycol
 - o Méthanol absolu
 - o Propylène glycol
 - o Toluène
- Réactif au bleu de tétrazolum
 1. Solution aqueuse de bleu de tétrazolum à 0,40 gramme %
 2. Solution aqueuse de soude à 10 grammes %

Mélanger au moment de l'emploi :

Réactif 1 2 parties

Réactif 2 1 partie (en volume)
- Réactif à l'hydrazide isonicotinique
 1. Solution alcoolo-chlorhydrique : 0,625 cm³ d'acide chlorhydrique concentré, éthanol absolu q.s.p. 1000 cm³
 2. Solution d'hydrazide isonicotinique : 0,500 gramme d'hydrazide isonicotinique, solution alcoolo-chlorhydrique q.s.p. 1000 cm³

Préparer le réactif à l'hydrazide isonicotinique extemporéamment.

II. RECUEIL DES URINES

Recueillir les urines de 24 heures sur 2 cg de cyanure de mercure ou 2 cg d'acide mercurithiosalicylique.

Conserver les urines à + 4° si l'extraction est différée.

III. TECHNIQUE

1. Hydrolyse. Extraction

Amener la totalité des urines à pH 1 au moyen d'acide chlorhydrique concentré et les saturer en chlorure de sodium.

Extraire immédiatement par le chloroforme suivant le schéma :

- 3 heures d'extraction par 100 cm ³ de chloroforme					
- 3	"	"	"	"	"
- 16	"	"	"	200 cm ³	"
- 2	"	"	"	100 cm ³	"

Séparer chaque fois le chloroforme par centrifugation.

2. Purification

a) lavage aux alcalins

Laver les extraits chloroformiques par :

2 fois 25 cm³ de soude N

2 fois 25 cm³ de soude 0,1 N

2 fois 25 cm³ de solution aqueuse saturée de chlorure de sodium

Sécher les extraits chloroformiques 12 heures à + 4° sur sulfate de sodium anhydre.

Evaporer les extraits sous vide à une température inférieure à 40°.

Reprendre le résidu 2 ou 3 fois par 2 cm³ de chloroforme (+ 1 goutte d'éthanol). Evaporer à une température inférieure à 40°.

b) chromatographie d'adsorption sur Florisil

Placer le Florisil sans trop le tasser sur une hauteur de 7 cm dans une allonge en verre de 1 cm de diamètre.

Humecter la colonne avec 5 cm³ de chloroforme, puis faire passer l'extrait urinaire dessous dans 5 cm³ de chloroforme.

Eluer les composants de l'extrait urinaire par :

25 cm³ de chloroforme contenant 0,5 % d'éthanol absolu

25 cm³ de chloroforme contenant 2 % d'éthanol absolu

50 cm³ de chloroforme contenant 20 % d'éthanol absolu.

Evaporer le dernier éluat à une température inférieure à 40°.

c) partage entre solvants

Dissoudre l'extrait urinaire dans 2 cm³ de méthanol à 70 % (7 parties de méthanol = 3 parties d'eau distillée en volume).

Ajouter 0,5 cm³ du mélange "éther de pétrole-toluène" à parties égales en volume, préparé extemporanément. Agiter par retournements. Eliminer la phase supérieure non polaire par capillarité à l'aide de bandelettes de papier filtre. Pratiquer cette opération 2 fois.

Evaporer la phase méthanolique à une température inférieure à 40°.

3. Séparation chromatographique

a) première chromatographie "système toluène, propylène glycol de ZAFFARONI".

Imprégner le chromatogramme de 12x43 cm par passage lent dans une solution de propylène glycol à 50 % dans le méthanol. L'essorer entre 2 feuilles de papier filtre.

Déposer sur les bords du chromatogramme les témoins (cortisone et hydrocortisone 10 microgrammes de chaque) et au centre l'extrait urinaire dissous dans le mélange "chloroforme-méthanol 4:1 en volume).

Chromatographier pendant 48 heures à la température du laboratoire.

Sécher le chromatogramme pendant 24 heures à l'obscurité.

b) élution

Repérer la position des stéroïdes témoins et à analyser en lumière ultra-violette à 240 mμ.

Découper la zone correspondant à la cortisone et située en dessous.

Eluer cette zone en chromatographie descendante par le mélange "chloroforme-méthanol 7:3 en volume" pendant 24 heures.

Fractionner l'éluat en 2 parties égales. Les évaporer à une température inférieure à 40°.

- c) deuxième chromatographie "système acétate de butyle éthylène glycol eau distillée de MATTOX et LEW-BART" (20:1:1 en volume).

Imprégner 2 chromatogrammes de 12x43 cm par passage lent dans une solution d'éthylène glycol à 40 % dans l'acétone. Les essorer entre 2 feuilles de papier filtre.

Déposer sur les bords de la feuille les témoins (aldostérone 5 et 10 microgrammes - cortisone 10 microgrammes) et au centre l'extrait urinaire dissous dans le mélange "chloroforme méthanol 4:1 en volume" et 10 microgrammes de cortisone comme entraîneur.

Chromatographier pendant 6 heures à la température du laboratoire.

Sécher les chromatogrammes pendant 24 heures à l'obscurité.

- d) élution

Repérer la position des stéroïdes témoins et à analyser en lumière ultra-violette à 240 m μ .

Découper sur l'un des chromatogrammes la zone correspondant à l'aldostérone et un témoin papier de même surface prélevé dans la zone située avant la ligne de départ.

Eluer ces zones en chromatographie descendante par le mélange "chloroforme-méthanol 7:3 en volume" pendant 24 heures.

Evaporer les éluats à une température inférieure à 40°.

4. Dosage

- a) réaction au bleu de tétrazolium

Pulvériser sur le chromatogramme non découpé la solution alcaline de bleu de tétrazolium. Laisser la coloration se développer 5 minutes environ.

Apprécier la quantité d'aldostérone présente dans l'extrait urinaire par comparaison visuelle avec les spots témoins d'aldostérone (5 et 10 microgrammes).

b) réaction à l'hydrazide isonicotinique

Purifier les résidus d'évaporation des éluats provenant de l'autre chromatogramme suivant la méthode d'OER-TEL et EIK-NES :

- reprendre les résidus d'évaporation par 3 fois 5 cm³ de chloroforme (Merck)
- laver l'extrait chloroformique par :
 - 10 cm³ de solution aqueuse d'acide sulfurique concentré à 0,5 %
 - 10 cm³ d'eau distillée
 - 5 cm³ " "
- évaporer le chloroforme à une température inférieure à 40°.

Ajouter aux résidus d'évaporation 2,5 cm³ de solution d'hydrazide isonicotinique.

Lire après une heure la densité optique à 380 m μ .

Retrancher la densité optique du témoin papier de la densité optique de l'extrait urinaire. Se reporter à la courbe d'étalonnage pour connaître la teneur en aldostérone.

CONCLUSIONS

- 1) Le dosage de l'aldostérone présente en très petites quantités (de l'ordre de quelques microgrammes) dans l'urine normale pose un problème analytique délicat.
- 2) Dans une première partie de ce travail nous avons étudié les méthodes chromatographiques de séparation de l'aldostérone.

- Le mélange de solvants (systèmes) de ZAFFARONI "toluène propylène glycol" se prête parfaitement à la séparation des extraits urinaires (souvent très contaminés) obtenus après extraction et purification.

- Il serait intéressant d'utiliser pour l'isolement final de l'aldostérone un système de type BUSH.

Dans ces systèmes le papier est imprégné par les vapeurs de la phase polaire (en général : méthanol-eau), alors que dans les systèmes de type ZAFFARONI le papier est imprégné par passage dans une solution de la phase polaire (propylène glycol, éthylène glycol, ou formamide). Il en résulte une plus grande rapidité de séchage du chromatogramme et ce qui est plus important : une absorption de base du papier beaucoup plus faible pour les dosages spectrophotométriques. Mais les chromatogrammes doivent être réalisés à une température comprise entre 30° et 38° suivant le type de solvants utilisés.

- Cependant les 2 systèmes de type BUSH que nous avons étudiés n'ont pu être retenus, car :

. le réglage minutieux de la température dans le système d'EBERLEIN et BONGIOVANNI "E2B" (butanol tertiaire-eau-isooctane) est une complication technique importante.

. la séparation de l'aldostérone et de la cortisone n'est pas satisfaisante dans le système de DI PERRI (toluène-pétrole léger-méthanol-eau en phases inversées à la température ordinaire).

- Nous avons dû alors retenir un système de type ZAF-FARONI : le système de MATTOX et LEWBART (acétate de butyle-éthylène glycol-eau) dans lequel on assure d'une manière efficace l'isolement de l'aldostérone.

- 3) La détermination quantitative exige avant tout une bonne séparation :

- la réaction au bleu de tétrazolium (caractérisation de la chaîne latérale α céto-lique) est une méthode de dosage sensible mais comporte une part subjective importante (appréciation de l'intensité et de la surface d'une tâche colorée par rapport à des standards).

- en l'absence de réactions spécifiques de caractérisation de l'aldostérone, il paraît intéressant d'avoir recours pour le dosage à un réactif s'adressant à un autre groupement fonctionnel de la molécule : le groupement Δ 4-3-céto. Le carbonyle de ce groupement est en particulier capable de conduire à la formation d'hydrazones.

- à la suite de CHEN, nous nous sommes intéressés à la formation d'une hydrazone salicylique de l'aldostérone. L'étude de la séparation de l'excès de réactif et de l'élution des hydrazones permet d'obtenir des résultats valables avec de l'aldostérone pure. Mais le passage à la détermination de l'aldostéronurie a donné des résultats sans rapport avec ceux donnés par la réaction au bleu de tétrazolium, probablement par impossibilité d'éliminer totalement l'excès de réactif. Nous avons été obligés d'abandonner cette technique.

- reprenant un travail d'UMBERGER ayant trait à la formation d'hydrazone isonicotinique des Δ 4-3-cétostéroïdes, nous avons essayé de l'appliquer à l'aldostérone. L'étude de la réaction sur le stéroïde pur a permis de fixer : le temps minima après lequel la réaction est complète et l'influence de la concentration des réactifs (acide chlorhydrique et hydrazide isonicotinique). Cette réaction est applicable à la détermination de l'aldostéronurie, à condition de purifier les éluats des chromatogrammes (technique d'OERTEL et EIKNES).

- 4) Nous avons pratiqué 394 dosages par la réaction au bleu de tétrazolium et 26 par la réaction à l'hydrazide isonicotinique.

- le taux normal statistique par la réaction au bleu de tétrazolium est de 2 à 5,3 microgrammes par 24 heures.

- le nombre restreint de dosages pratiqués par la réaction à l'hydrazide isonicotinique nous empêche de définir un taux statistique normal. Cependant la connaissance des pertes occasionnées par les opérations supplémentaires de la réaction à l'hydrazide isonicotinique (élution et purification des éluats) nous permet de penser que les taux normaux sont de 1,5 à 4,1 microgrammes par 24 heures.

- 5) Nous n'avons pas eu l'occasion de pratiquer de dosages dans le cas d'hyperaldostéronisme primaire, mais nous avons trouvé des hyperaldostéronuries chez des malades porteurs d'oedèmes d'origine rénale ou hépatique.
- 6) Nous avons montré que la thérapeutique à la spironolactone (Aldactone) était responsable de l'apparition dans l'urine de métabolites interférant dans la réaction à l'hydrazide isonicotinique.
- 7) Pour éviter cette cause d'erreur et pour pallier l'insuffisance des réactions non spécifiques de caractérisation de l'aldostérone, nous proposons d'effectuer son dosage dans l'urine par deux réactions : la réaction au bleu de tétrazolium et la réaction à l'hydrazide isonicotinique.

Nous identifions ainsi l'aldostérone avec certitude par sa position sur les chromatogrammes et par la caractérisation de ses deux groupements fondamentaux : la chaîne latérale α cétolique en C 17 et le groupement Δ 4-3-céto.

VU, le Doyen :

HERMANN

Le Président de la Thèse :

Professeur BADINAND

Vu et permis d'imprimer,
Lyon, le 29 mai 1963

Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université,

P. LOUIS

B I B L I O G R A P H I E

1. ADAMEC (O) , MATIS (J) , GALVANEK (M). - Chromatographic separation of corticosteroids on a thin layer of silica gel. Lancet. 1962, 81-82.
2. AXELRAD (BJ) , CATES (JE) , JOHNSON (BB) , LUETSCHER (JA). - Aldosterone in urine of normal man and of patients with edema. Its increased recovery after hydrolysis with acid and with β glucuronidase. Brit. Med. J. 1955,1,196-9.
3. AYRES (PJ) , HECHTER (O) , SABA (H) , SIMPSON (SA) , TAIT (JF). - Intermediates in the biosynthesis of aldosterone by capsule strippings of ox adrenal gland. Biochem. J. 1957,65,22P.
4. AYRES (PJ) , GOULD (RP) , SIMPSON (SA) , TAIT (JF). - Cités dans "Recent. Progress. Hormone. Research".1959, 15,275-310.
5. AYRES (PJ) , EICHHORN (J) , HECHTER (O) , SABA (N),TAIT (JF) , TAIT (SAS). - Some studies on the biosynthesis of aldosterone and other adrenal steroids. Acta. Endocrinol. 1960,33,27-58.
6. AYRES (PJ) , GARROD (O) , SIMPSON (SA) , TAIT (JF). - A method for the determination of aldosterone, cortisol and corticosterone in biological extracts particularly applied to human urine. Biochem. J. 1957,65,639-46 et 647-51.
7. BADINAND (A) , REVOL (A). - Spécificité des réactions analytiques des stéroïdes en C21. Biol. Méd. 1958,47, 161-80.
8. BARTTER (FC). The role of aldosterone in normal homeostasis and in certain disease states. Metabolism.1956, 5,369-83.

9. BARTTER (FC) , LIDDLE (GW) , DUNCAN (LE) , BARBER (JK), DELEA (C). - The regulation of aldosterone secretion in man ; the role of fluid volume. J. Clin. Invest. 1956, 35,1306-15.
10. BARTTER (FC) , MILLS (IH) , BIGLIERI (EG) , DELEA (C). Studies on the control and physiologic action of aldosterone. Recent. Progress. Hormone. Research. 1959,15, 311-35.
11. BARTOS (J) . - Sur l'analyse des 3 cétostéroïdes à l'aide du 2,6-diterbutyl-p-crésol. Ann. Pharm. Fr.1959,17, 141-4.
12. BAULIEU (EE) , DE VIGAN (M) , JAYLE (MF). - Recherche et mesure physico-chimique de l'aldostéronurie dans divers types d'hypercorticisme surrénalien de l'adulte (hyperplasies et tumeurs). Ann. Endocrinol. 1956,17,88-97.
13. BAULIEU (EE) , JAYLE (MF). - Etude de l'équilibre entre β hydroxy et 11 cétostéroïdes. I. Mesure de la cortisone, du cortisol et de leurs métabolites tétrahydrogénés urinaires, après administration de cortisone , cortisol et ACTH à l'homme. Bull. Soc. Chim. Biol. 1957,39,37-57.
14. BAULIEU (EE) , DE VIGAN (M). - Dosage physico-chimique de l'aldostérone urinaire. Mise au point technique. Rev. Fr. Et. Clin. Biol. 1958,3,71-4.
15. BEIN (HJ) , JAKES (R). - The antitoxic effect of aldosterone. Experientia. 1960,16,24-6.
16. BIRON (P) , KOIW (E) , NOWACZINSKI (W) , BROUILLET (J), GENEST (J). - The effects of intravenous infusions of valine - 5 angiotensin II and other pressor agents on urinary electrolytes and corticosteroids, including aldosterone. J. Clin. Invest. 1961,40,338-347.
17. BOJESSEN (E) , DEGN (H). - A double isotope derivative method for the determination of aldosterone in peripheral plasma. The effect of adrenalectomy on aldosterone level anesthetized dogs. Acta. Endocrinol. 1961, 37,541-58.

18. BONDI (S). - Synthese des Salicylsäurehydracid. Z. Physiol. Chem. 1907,52,171-72.
19. BROMBACHER (PJ) , HARTING (MC). - A simplified and reliable method for urine aldosterone determination in the clinical routine laboratory. Clin. Chim. Acta. 1961, 6,886-7.
20. BROOKS (RV) , MILLES (IH) , PRUNTY (FTG). - A new urinary steroid related to mineral metabolism. Lancet. 1956,271,925-6.
21. BROOKS (RV). - A method for the determination of aldosterone. Mem. Soc. Endocrinol. 1960,n°8,9-16.
22. BRUINELS (J) , VAN NOORDWIJK (J). - Fluorescence of aldosterone in sulphuric acid. Nature 1962,193,1260-2.
23. BURTON (RB) , ZAFFARONI (A) , KEUTMAN (EH). - Paper chromatography of steroids II Corticosteroids and related compounds. J. Biol. Chem. 1951,188,763-71.
24. BURTON (RB) , ZAFFARONI (A) , KEUTMAN (EH). - Corticosteroids in urine of normal persons determined by paper chromatography. J. Biol. Chem. 1951,193,769-79.
25. BUSH (IE). - Methods of paper chromatography of steroids applicable to the study of steroids in mammalian blood and tissues. Biochem. J. 1952,50,370-8.
26. BUSH (IE). - The possibilities and limitations of paper chromatography as a method of steroid analysis. Recent. Progress. Hormone. Research. 1954,9,321-35.
27. CAMBER (B). - Salicyloyl hydrazide : a reagent of wide use in organic and histochemical analysis . Nature 1954,174,1107.
28. CAMBER (B). - Estimation of phenolic substances : use of stabilized p-amino diethylaniline. Nature. 1955,175,1085.
29. CAMBER (B). - Salicyloylhydrazide as a reagent for the characterisation and estimation of simple and steroidal aldehydes and ketones. Clin. Chim. Acta. 1957,2,188-98.

30. CARR (HE) Jr , REDDY (WJ). - Reversed phase partition chromatography of steroids. *Anal. Biochem.* 1961,2,152-60.
31. CELLA (JA) , BROWN (EA) , BURTNER (RR). - Steroidal aldosterone blockers. *J. Org. Chem.* 1959,24,743-48.
32. CELLA (JA) , TWEIT (RC). - Steroidal aldosterone blockers. *J. Org. Chem.* 1959, 24,1109-10.
33. CELLA (JA) , KAGAWA (CM). - Steroidal lactones. *J. Amer. Chem. Soc.* 1957,79,4808-9.
34. CHART (JJ) , SHIPPLEY (ES). - The mechanism of sodium retention in cirrhosis of the liver. *J. Clin. Invest.* 1953,32,560.
35. CHART (JJ) , GORDON (ES) , HELMER (P) , LESHER (M) . Metabolism of salt retaining hormone by surviving liver slices. *J. Clin. Invest.* 1956,35,254-60.
36. CHEN (PS). - Spectrophotometric determination of Δ 4-3-ketosteroids with salicyloyl hydrazide. Application to urinary aldosterone. *Anal. Chem.* 1959,31,292-6.
37. CINGOLANI (E) , CAVINA (G) , AMORNINO (V). - Sul controllo dei corticosteroidi nei preparati farmaceutici. La reazione con idrazide isonicotinica. *Farmaco. Ed. Prat.* 1960,n°5,301-10.
38. CLARK (L). - A colorimetric reaction for the estimation of cortisone, hydrocortisone, aldosterone and related steroids. *Nature.* 1955,175,123-5.
39. CONN (JW). - Primary aldosteronism : a new clinical syndrome. *J. Lab. Clin. Med.* 1955,45,6-17.
40. CONN (JW) , MICH (AA). - Primary aldosteronism. *J. Lab. Clin. Med.* 1955,45,661-4.
41. CRISTOL (P). - A propos de l'utilisation du système "toluène, acétate d'éthyle" pour la chromatographie sur papier des corticostéroïdes α cétoles. *Ann. Biol. Clin.* 1958,16,357-9.

42. COURRIER (R) , COLONGE (R) , MOREL (F). - L'aldostérone possède-t-elle des propriétés progestatives . Arch. Anat. Micr. Morphol. Expér. 1959,48 bis,57-61.
43. DYRENFURTH (I) , VENNING (EH). - Studies on the assay of aldosterone chromatography and chemical determination. Endocrinology. 1959,64,648-63.
44. DI PERRI (T) , RAVENNI (G) , RUBEGNI (M). - Aldosterone separation from biological extracts by two reversed phase paper chromatographic systems. Clin. Chim. Acta. 1960,5,420-2.
45. DI PERRI (T) , RAVENNI (G) , RUBEGNI (M). - Dossaggio dell'aldosterone nelle urine. G. Biochim. 1958,7,102-11.
46. DAUGHADAY (WH) , HOLLOSZY (J) , MARIZ (IK). - Binding of corticosteroids by plasma proteins. The binding of cortisol and aldosterone by corticosteroid-binding globulin and by the estrogen-induced binding system of plasma. J. Clin. Endocrinol. Metabol. 1961,21,53-61.
47. DI PERRI (T) , RAVENNI (G) , RUBEGNI (M). - Idrolisi rapida a caldo dei coningati urinari dell'aldosterone. Tecnica e risultati. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 1959, 35,413-5.
48. DAVIS (JO) , YANKOPOULOS (NA) , LIEBERMAN (F) , HOLMAN (J) , BAHN (RC) , CASPER (A). - The role of the anterior pituitary in the control of aldosterone secretion in experimental secondary hyperaldosteronism. J. Clin. Invest. 1960,39,765-73.
49. DEANE (HW) , SHAW (JH) , GREEP (RO). - The effect of altered sodium and potassium intake on the width and cytochemistry of the zona glomerulosa of the rat's adrenal cortex. Endocrinology. 1948,43,133-53.
50. DYRENFURTH (L) , STACEY (CH) , BECK (JC) , VENNING (EH). Aldosterone excretion in patients with cirrhosis of the liver. Metabolism. 1957,6,544-5.
51. EBERLEIN (WR) , BONGIOVANNI (AM). - New solvent systems for the resolution of corticosteroids by paper chromatography. Arch. Biochem. Biophys. 1955,59,90-6.

52. EDWARDS (RW). - Two dimensional chromatography of corticosteroids. *Biochem. J.* 1962,82,48-9 P.
53. EXLEY (D) , SHIRLEY (CI) , NORIMBERSKI (JK) , WOODS (GF). - Indirect analysis of corticosteroids. 5. The determination of 17 deoxycorticosteroids. *Biochem. J.* 1961,81,428-34.
54. FALBRIARD (A) , MULLER (AF) , NEHER (R) , MACH (RS) . Etudes des variations de l'aldostéronurie sous l'effet de surcharges en potassium et de déperditions rénales et extrarénales de sel et d'eau. *Schweiz. Med. Wschr.* 1955,85,1218-20.
55. FARRELL (G). - Regulation of aldosterone secretion. *Physiol. Rev.* 1958,38,709-28.
56. FARRELL (G). - The physiological factors which influence the secretion of aldosterone. *Recent. Progress. Hormone. Research.* 1959,15,275-97.
57. FLOOD (C) , LAYNE (DS) , RAMCHARAN (S) , ROSSIPAL (E), TAIT (JF) , TAIT (SAS). - An investigation of the urinary metabolites and secretion rates of aldosterone and cortisol in man and a description of methods for their measurement. *Acta. Endocrinol.* 1961,36,237-64.
58. FUCHS (M) , MOYER (JH) , NEWMAN (BE). - Spirolactones use as diuretics based on aldosterone's action. *Drug. Trade. News.* 1960,35,42-4.
59. GARST (JB) , SHUNWAY (NP) , SCHWAZ (H) , FARRELL (G) . Aldosterone secretion in essential hypertension . *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 1960,20,1351-9.
60. GIROUD (CJP) , SAFFRAN (M) , SCHALLY (AV) , STACHENKO (J) , VENNING (EH). - Production of aldosterone by rat adrenal glands in vitro. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 1956,92,855-9.
61. GORNALL (AG) , MACDONALD (MP). - Quantitative determination of the steroids hormones with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *J. Biol. Chem.* 1953,201,279-97.

62. GRANT (JK). -- Studies on the biosynthesis of the adrenal steroid. British. Med. Bull. 1962,18,99-105.
63. GUINET (P). -- Les syndrômes d'hyperaldostéronisme. Rev. Prat. 1960,10,1979-88.
64. HERNANDO (L) , CRABBE (J) , ROSS (EJ) , REDDY (WJ) , RENOLD (AE) , NELSON (DH) , THORN (GW). -- Clinical experience with a physico-chemical method for estimation of aldosterone in urine. Metabolism. 1957,6,518-43.
65. HEUSLER (K) , KALVODA (J) , MEYSTRE (CH) , WIELAND (P), ANNER (G) , WETTSTEIN (A) , CAINELLI (G) , ARIGONI (D), JEGER (O). -- Partial synthèse des aldostérons. Experientia. 1960,16,21-4.
66. HOFFMAN (H) , STAUNDINGER (HJ). -- Papierchromatographische Trennung und Bestimmung der Nebennierenrindenhormone. Biochem. Z. 1952,322,230-6.
67. HOFFMAN (H) , STAUNDINGER (HJ). -- Papierchromatographische Trennung und Bestimmung der Nebennierenrindenhormone. Naturwissenschaften. 1951, 38,213.
68. INABA (M) , TOZAWA (M) , EBARA (T) , NAKAO (T). -- Magnesium silicate - water system. chromatography for the separation. of corticosteroids. Endocrinol. Jap. 1960,7,353-6.
69. JAYLE (MF) , BAULIEU (EE) , DESGREZ (P) . -- Analyse des corticostéroïdes dans "Analyse des stéroïdes hormonaux" tome II page 113. Masson et Cie Eds.
70. JOHNSON (BB). -- Bioassay of adrenal cortical steroids on the basis of electrolyte excretion by rats : effects of II desoxy and II oxysteroids. Endocrinology. 1954,54,196-208.
71. JONES (KM) , LLYOD-JONES (R) , RIONDEL (A) , TAIT (JF), TAIT (SAS) , BULBROOK (RD) , GREENWOOD (FC). -- Aldosterone secretion and metabolism in normal men and women and in pregnancy. Acta. Endocrinol. 1959,30,321-42.

72. KAGAWA (CM). - Blocking the renal electrolyte effects of mineralocorticoids with an orally active steroidal: Spirolactone. *Endocrinology*. 1960,67,125-32.
73. KAGAWA (CM) , CELLA (JA) , VAN ARMAN (CG). - Action of new steroids in blocking effects of aldosterone and deoxycorticosterone on salt. *Science*. 1957,126,1015-16.
74. KAHNT (FW) , NEHER (R) , WETTSTEIN (A). - Umwandlung von radioaktiven cortexon in aldosteron durch neben-nieren-enzyme. *Experientia* 1955,11,446-7.
75. KAHNT (FW) , NEHER (R). - On the specific inhibition of adrenal steroid biosynthesis. *Experientia*.1962,18, 499-501.
76. KALANT (H). - Fluorimetric measurement of adrenocortical steroids in concentrated acid solution. *Biochem J*. 1958,69,93-8.
77. KALANT (H). - Chromogenic and fluorogenic reactions of adrenocortical and others steroids in concentrated acids. *Biochem. J*. 1958,69,79-93.
78. KEKWICK (A) , PAWAN (GLS). - Oral aldosterone effect in a case of Addison's disease. *Lancet*. 1954,267,162-4.
79. KLIMAN (B) , PETERSON (RE). - Double isotope derivative assay of aldosterone in biological extracts. *J. Biol. Chem*. 1960,235,1639-48.
80. KLIMAN (B) , FOSTER (DW). - Analysis of aldosterone by gas-liquid chromatography. *Anal. Biochem*. 1962,3, 403-7.
81. LABADIE (P).,- Etudes sur l'estimation physico-chimique de l'aldostérone urinaire. *Pathol. Biol*. 1959,7, 1461-70.
82. LAUBIE (H). - Sur la réaction nitroprussique des cétones stéroïdes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. 1959,98, 172-3.

83. LECHEVIN (JC) , MALLEIN (R) , REVOL (A) , BADINAND (A). Dosage de l'aldostérone urinaire utilisant la réaction avec l'isonicotinyl hydrazide de (INH). Toulouse Pharmaceutique. 1961,8,41-4.
84. LECHEVIN (JC) , MALLEIN (R) , REVOL (A) , BADINAND (A). Méthodes chimiques de dosage de l'aldostérone urinaire. Applications aux urines de malades traités par les spiro lactones. Colloque sur la spironolactone. Juin 1962.
85. LEGRAND (JC1) , PASQUALINI (JR) , JAYLE (MF). -- Détermination quantitative de lactones de stéroïdes. Bull. Soc. Chim. Biol. 1962,44,997-1007.
86. LEWBART (ML) , MATTOX (VR). - Extention of the Porter-Silber reaction to 17 deoxy ketolic steroids. Anal. Chem. 1961,33,559-61.
87. LEWIS (B). - Preparation of paper for quantitative chromatography of corticosteroids. Biochim. Biophys. Acta. 1956,20,396.
88. LIDDLE (GW). - Sodium diuresis induced by steroidal antagonists of aldosterone. Science. 1957,126,1016-18.
89. LLAURADO (JG). -- Nachweis den electrolytstoffwechsel steuernder corticoide mit dem Na^+/K^+ test an neben-nierenlosen ratten und bemerkungen über methoden der aldosteron-extraktion aus menschlichen urine. Klin. Wschr. 1956,34,669-74.
90. LUETSCHER (JA) , AXELRAD (BJ). -- Sodium-retaining corticoid in the urine of normal children and adults and of patients with hypoadrenalism or hypopituitarism. J. Clin. Endocrinol. Metabol. 1954,14,1086-9.
91. LUETSCHER (JA) , NEHER (R) , WETTSTEIN (A). -- Isolation of crystalline aldosterone from the urine of a nephrotic patient. Experientia. 1954,10,456-8.
92. MAC KINLEY (WP). - Paper electrophoresis of steroid derivatives. Science. 1955,121,139-40.
93. MACH (RS) , MULLER (AF). - Physiopathologie et clinique de l'aldostérone. Schweiz. Med. Wschr. 1959,89,997-1005.

94. MACH (RS) , FABRE (J) , MULLIER (AF) , NEHER (R). - Oedèmes par rétention de chlorure de sodium avec hyperaldostéronurie. Essai de classification des états d'hyperaldostéronurie. *Schweiz. Med. Wschr.* 1955,85, 1229-34.
95. MACH (RS) , MULLER (AF). - L'inhibition de la sécrétion d'aldostérone par l'amphénone. *Soc. Med. Hôp. Paris.* 1957,73,290-5.
96. MACH (RS) , MACH (E) , FABRE (J). - L'aldostérone . Effets biologiques et cliniques. *Sem. Hôp. Fr.* 1955, 31,67-70.
97. MADER (WJ) , BUCK (RR). - Colorimetric determination of cortisone and related steroids. *Anal. Chem.* 1952, 24,666-7.
98. MALLEIN (R) , BESSET (C) , OLIVIER (L) , VACHON (A) . Les modifications de l'aldostérone urinaire et le rôle de l'hyperaldostéronisme dans le syndrome hydropigène des cirrhotiques. *Lyon. Med.* 1961,205,1045-53.
99. MARTIN (EA) , SALVADOR (R). - Etude de quelques facteurs influençant le dosage des corticoides par les sels de tétrazolium. *Rev. Canad. Biol.* 1959,18,1-22.
100. MATIS (J) , ADAMEC (O) , GALVANEK (M). - Use of a thin layer of calcium sulphate for the chromatographic separation of corticosteroids. *Nature.* 1962,194,477-8.
101. MATTOX (VR) , MASON (HL) , ALBERT (A). - Isolation of a sodium-retaining substance from beef adrenal extract. *Proc. Staff. Meeg. Mayo. Clin.* 1953,28,569-76.
102. MATTOX (VR) , MASON (HL) , ALBERT (A). - The preparation on a microgram scale of some derivatives of aldosterone : their use in paper chromatography. *J. Biol. Chem.* 1956,218,359-64.
103. MATTOX (VR) , LEWBART (ML). - New Zaffaroni type solvent systems for chromatography of relatively polar steroids. *Archiv. Biochem. Biophys.* 1958,76,362-6.

104. METZ (H). -- Dünnschichtchromatographische Schnella-
nalyse bei enzymatischen Steroid-Umsetzungen. Natur-
wissenschaften. 1961,48,569-70.
105. MOOLENAR (AJ). -- Chemical estimation of aldosterone
in urine (Preliminary communication). Lancet. 1956,
271,556.
106. MOOLENAR (AJ). A new method for the colorimetric de-
termination of aldosterone in urine. Acta. Endocri-
nol. 1957,25,161-72.
107. MULLER (AF) , VEYRAT (R) , MANNING (EL). -- Etude de
la sécrétion de l'aldostérone par l'aldostérone mar-
quée au tritium. Helv. Med. Acta. 1959,26,714-9.
108. MULLER (AF) , RIONDEL (AM) , MANNING (EL). -- Méca-
nismes régulateurs de l'aldostérone chez l'homme .
Helv. Med. Acta. 1956,23,610-6.
109. MULLER (AF) , RIONDEL (AM) , MANNING (EL).-- Influen-
ce de l'ACTH sur la sécrétion de l'aldostérone.Helv.
Med. Acta. 1956,23,572-7.
110. MULROW (PJ) , COHN (GL). -- Conversion of corticoste-
rone-4-CI4 to aldosterone by human adrenal slices .
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 1959,101,731-54.
111. NAKAO (T) , INABA (M) , TOZAWA (M). -- Water-system pa-
per chromatography for separation of corticosteroids
Jikeikai. Med. J. 1960,7,1-9.
112. NEHER (R) , WETTSTEIN (A). -- Physicochemical detec-
tion and measurement of aldosterone in body fluids
and tissues. Acta. Endocrinol. 1955,18,386-95.
113. NEHER (R) , WETTSTEIN (A). -- Physicochemical estima-
tion of aldosterone in urine. J. Clin. Invest. 1956,
35,800-5.
114. NEHER (R) , WETTSTEIN (A). -- Uber stereoide. 144 Mit-
teilung. Isolierung und konstitutionsermittlung wei-
terer pregnanverbindungen aus nebennieren. Helv.Chim.*
Acta. 1956,39,2062-88.

115. NEHER (R) , WETTSTEIN (A). - Isolierung und identifizierung neuer nebennieren sterioide ; charakterisierung weiterer inhaltstoffe. *Helv. Chim. Acta.* 1960, 43, 1171-91.
116. NEHER (R) , WETTSTEIN (A). - Zur biosynthese des Aldosterons : isolierung eines C20 steroid-lactons aus schweine-nebennieren. *Helv. Chim. Acta.* 1960, 43, 623-8.
117. NELSON (DH) , SAMUELS (LT). - A method for the determination of 17 hydroxycorticosteroids in blood : 17 hydroxycorticosterone in the peripheral circulation. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 1952, 12, 519-26.
118. NOWACZINSKI (W) , GENEST (J). - Recovery of aldosterone, hydrocortisone and cortisone following dialysis. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 1955, 15, 1310-2.
119. NOWACZINSKI (W) , GOLDNER (M) , GENEST (J). - Microdetermination of corticosteroids with tetrazolium derivatives. *J. Lab. Clin. Med.* 1955, 45, 818-21.
120. NEWMAN (AE) , REDGATE (ES) , FARRELL (G). - The effects of diencephalic mesencephalic lesions on aldosterone and hydrocortisone secretion. *Endocrinology.* 1958, 63, 723-36.
121. NOWACZINSKI (W) , STEYERMARK (PR) , KOIW (E), GENEST (J) , JONES (RN). - Delayed study of a purified urinary aldosterone fraction. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 1956, 34, 1023-38.
122. NOWACZINSKI (W) , KOIW (E) , GENEST (J). - New method for the isolation and determination of urinary aldosterone. *Clin. Res. Proc.* 1957, 5, 14-5.
123. NOWACZINSKI (W) , KOIW (E). - A new paper chromatographic system for the separation of polar corticosteroids. *J. Lab. Clin. Med.* 1957, 49, 815-8.
124. NOWACZINSKI (W) , KOIW (E) , GENEST (J). - Chemical method for the determination of urinary aldosterone. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 1957, 35, 425-43.

125. OERTEL (GW). - Bestimmung von corticoiden auf papierchromatogrammen. Acta. Endocrinol. 1954,16,267-9.
126. OERTEL (GW) , EIK-NES (KB). -Reinigung von papierextrakten zur quantitativen bestimmung von steroiden. Naturwissenschaften. 1959,46,261-2.
127. PECHET (MM). - New method for rapid chromatographic separation and identification of adrenocortical steroids. J. Clin. Endocrinol. Metabol. 1953,13,1542-4.
128. PECHET (MM). - Method for the chromatographic separation of very polar steroids. Science. 1955,121,39-40.
129. PETERSON (RE). - The miscible pool and turnover rate of adrenocortical steroids in man. Recent. Progress. Hormone. Research. 1959,15,231-74.
130. PRUSIKOWA (M). - Neue system zur trennung der corticosteroide durch papier-chromatographie. Naturwissenschaften. 1958,45,466-7.
131. RAUSCHKOLB (EW) , FARRELL (G). - Evidence for diencephalic regulation of aldosterone secretion. Endocrinology. 1956,59,526-31.
132. REICH (H) , KRANE (KF) , SANFILLIPO (SJ). - The reaction of steroid ketones with 2,4-dinitrophenylhydrazine. J. Org. Chem. 1953,18,822-32.
133. ROSEMBERG (E) , ROSENFELD (G) , UNGAR (R) , DORFMAN (RI). - Conversion of steroids to aldosterone like material. Endocrinology. 1956,58,708-13.
134. ROMANI (JD). - Le dosage de l'aldostérone urinaire . Technique. Résultats. Presse. Méd. 1958,66,837-8.
135. ROMANI (JD). - Acquisitions récentes sur le mécanisme physio-pathologique des oedèmes chroniques. Biol. Méd. 1959,48,494-518.
136. ROMANI (JD). - L'hyperaldostéronisme secondaire de l'insuffisance cardiaque. Etude pathogénique et implications physio-pathologiques. Presse. Méd. 1960,68,441-3.

137. ROSS (EJ). - Biological properties of aldosterone .
Physiological and pathological implications. Brit. Med.
Bull. 1962, 18, 99-105.
138. SALA (G) , LUETSCHER (JA). - The effects of sodium -
retaining corticoid electrocortin, desoxycorticosterone
and cortisone on renal function and excretion of
sodium and water in adrenalectomized rats. Endocrinology.
1954, 55, 516-8.
139. SCHMIDLIN (J) , ANNER (G) , BILLETER (JR) , WEITTS-
TEIN (A). - Uber synthesen in der aldosteron reihe. I
Totalsynthese des racemischen aldosterons. Experientia.
1955, 11, 365-8.
140. SCHULZ (EP) , NEUSS (JD). - Colorimetric assay for
cortisone, hydrocortisone and related steroids. Anal.
Chem. 1957, 29, 1662-5.
141. SCHWARZ (V). - Quantitative paper chromatography of
reducing steroids of the adrenal cortex. Biochem. J.
1953, 53, 148-52.
142. SELTZER (HS) , CLARK (DA). - Evidence for conversion
of corticosterone to aldosterone in man. Proc. Soc.
Exper. Biol. Med. 1958, 98, 674-6.
143. SIMPSON (SA) , TAIT (JF). - A quantitative method for
the bioassay of the effect of adrenal cortical ste-
roids on mineral metabolism. Endocrinology. 1952, 50,
150-61.
144. SIMPSON (SA) , TAIT (JF) , WETTSTEIN (A) , NEHER (R),
VON EUW (J), REICHSTEIN (T). - Isolierung eines neuen
kristallisierten hormons aus nebennieren mit beson-
ders hoher wirksamkeit auf den mineralstoffwechsel .
Experientia. 1953, 9, 333-5.
145. SIMPSON (SA), TAIT (JF), WETTSTEIN (A), NEHER (R), VON EUW
(J) , SCHINDLER (O) , REICHSTEIN (T). - Aldosteron .
Isolierung und eigenschaften. Uber bestandteile der
nebennierenrinde und verwandte stoffe. Helv. Chim .
Acta. 1954, 37, 1163-200 et 1200-23.
146. SINGER (B) , VENNING (EH). - Method of assay of a so-
dium-retaining factor in human urine. Endocrinology.
1953, 52, 623-33.

147. SLATER (JDH) , MOXHAM (A) , HURTER (R) , NABARRO (JDN). Clinical and metabolic effects of aldosterone antagonist. *Lancet*. 1959,277,931-4.
148. SMITH (LL) , FOELL (T). - Differentiation of Δ 4-3-ketosteroids and Δ 1,4-3-ketosteroids with isonicotinic acid hydrazide. *Anal. Chem.* 1959,31,102-5.
149. SOBEL (C) , HENRY (RJ) , GOLUB (OJ) , RUDY (M). Chemical determination of aldosterone in urine. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 1959,19,1302-11.
150. STARKA (L) , PRUSIKOWA (M). - Paper chromatography of steroids in systems with ethylene glycol as the stationnary phase. *J. Chromatogr.* 1959,2,304-7.
151. STAUB (MC) , DINGMAN (JF). - Rapid method for determination of aldosterone in human urine by glass paper chromatography. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 1961,21,148-56.
152. SWINGLE (WW) , MAXWELL (R) , BEN (M) , BAKER (C) , LEBRIE (SJ) , EISLER (M). - A comparative study of aldosterone and other steroids in adrenalectomized dog. *Endocrinology*. 1954,55,813-21.
153. TAIT (SAS) , TAIT (JF). - Assay of aldosterone and metabolites dans "Methods in hormone research" volume I. Chemical determination. Chapitre 7, page 265 - 336.
154. TOUCHSTONE (JC) , HSU (CT). - Determination of Δ ketolic substances in urinary extracts and paper chromatograms. *Anal. Chem.* 1955,27,1517-9.
155. TRAVIS (RH) , FARRELL (G). - In vitro biosynthesis of isotopic aldosterone. Comparison of precursors. *Endocrinology*. 1958,63,882-6.
156. TRUNIGER (B). - Untersuchungen zum problem des sekundären hyperaldosteronismus bei ödemkrankheiten *Helv. Med. Acta*. 1960,27,119-50.
157. TUZSON (J). - Paper chromatography of corticosteroids at room temperature. *Nature*. 1959,184,1937.

158. ULICK (S) , LARAGH (JH) , LIEBERMAN (S). - The isolation of a urinary metabolite of aldosterone and its use to measure the rate of secretion of aldosterone by the adrenal cortex of man. *Trans. Assoc. Am. Physicians.* 1958,71,225-35.
159. UMBERGER (EJ). - Isonicotinic hydrazide as a reagent for determination of Δ 4-3-ketosteroids. Determination of progesterone and testosterone propionate in oils solutions. *Anal. Chem.* 1955,27,768-73.
160. UNDERWOOD (RH) , FLOOD (CA) , TAIT (SAS) , TAIT (JF). A comparison of methods for the acid hydrolysis of a urinary conjugate of aldosterone. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 1961,21,1092-8.
161. VANDENHEUVEL (WJA) , HORNING (EC). - Gaz chromatography of adrenal cortical steroid hormones. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1960,3,356-60.
162. VELLUZ (L) , MULLER (G) , BARDONESCHI (R) , POITTEVIN (A). - Sur un accès à l'aldostérone à partir de structures stéroïdes de la série biliaire. *C.R. Acad. Sci. Fr.* 1960,250,725-7.
163. VERNON (R) , MATTOX (VR) , MARVIN (L) , LEWBART (ML). The determination of aldosterone in urine. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 1959,19,1151-61.
164. VESIN (F) , JACQUIER (Cl) , BAULIEU (EE) , CATTAN (R). Hyperaldostéronisme et oedèmes cirrhotiques. Action de la cortisone. *Soc. Méd. Hôp. Paris.* 1957,73,383-97.
165. VISCHER (E) , SCHMIDLIN (J) , WETTSTEIN (A). - Microbiologische spaltung razemischer steroide. Synthese von d-Aldosteron. *Experientia.* 1956,12,50-2.
166. VOIGT (KD) , SCHROEDER (W) , BECKMANN (I). - Chromatographic and electrophoretic determination of corticosteroids. *Acta. Endocrinol.* 1955,18,325-41.
167. WEICHSELBAUM (TE) , MARGRAF (HW). - Determination of Δ 4-3-ketocorticosteroids in human peripheral plasma by the isonicotinic acid hydrazide (INH) reaction. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 1957,17,959-65.

168. WEISZ (P) , MARTON (J) , GOSTONYL (T). - Chromatographic estimation of corticosteroids by 14 C labeled tetrazolium. *Lancet*. 1960,279,286.
169. WETTSTEIN (A). - L'Aldostérone. Exposés annuels de Biochimie médicale. 1957,19,171-91.
170. WETTSTEIN (A). - Biosynthèse des hormones stéroïdes. *Experientia*. 1961,17,329-344.
171. WIELAND (P) , HEUSLER (K) , WETTSTEIN (A). - Synthese aldosteron ähnlicher corticoïde d-l 17 hydroxyaldosteron. *Helv. Chim. Acta*. 1960,43,617-23.
172. WOLFF (HP) , KOCZORCK (KR). - Über die ausscheidung von aldosteron im harm von patienten mit hepatitis epidemica und lebercirrhose. *Klin. Wschr.* 1955,33,1104-5.
173. WOTIZ (HH) , NAUKKARINEN (I) , CARR (HE) Jr. - Gas chromatography of aldosterone. *Biochim. Biophys. Acta*. 1961,53,449-52.
174. ZAFFARONI (A) , BURTON (RB) , KEUTMANN (EH). - The application of paper partition chromatography to steroid analysis. *J. Biol. Chem.* 1949,177,109-116.
175. ZAFFARONI (A) , BURTON (RB) , KEUTMANN (EH). - Adrenal cortical hormones : analysis by paper partition chromatography and occurrence in the urine of normal persons. *Science*. 1950,111,6-8.
176. ZAFFARONI (A) , BURTON (RB) . - Identification of corticosteroids of beef adrenal extract by paper chromatography. *J. Biol. Chem.* 1951,193,749-67.
177. ZAFFARONI (A). Micromethods for the analysis of adrenocortical steroids. *Recent. Progress. Hormone. Research*. 1953,8,51-86.
178. An international symposium on aldosterone. 1958. Churchill. Ed. Londres. par MULLER (AF) et O'CONNOR (CM).

179. Chromatographie en chimie organique et biologique sous la direction de LEDERER (E). Tome II : Chromatographie des stérols, stéroïdes et substances apparentées par NEHER (R).
 180. L'année endocrinologique 1957. Masson. Cie. Eds. p. 5-41.
 181. L'année endocrinologique 1958. Masson. Cie. Eds. p. 10-34 et 35-56.
 182. L'année endocrinologique 1959. Masson. Cie. Eds. p. 55-88.
 183. L'année endocrinologique 1960. Masson. Cie. Eds. p. 5-58.
 184. L'année endocrinologique 1961. Masson. Cie. Eds. p. 23-36.
 185. L'année endocrinologique 1962. Masson. Cie. Eds. p. 5-23.
 186. Colloque sur la spironolactone. Evian 1962.
-

TABLE DES MATIERES

	pages
INTRODUCTION.....	1
PLAN DU TRAVAIL.....	3
 PREMIERE PARTIE.....	 9
I. Structure, propriétés physico-chimiques et synthèse de l'aldostérone.....	11
II. Métabolisme, propriétés physiologiques de l'aldostérone.....	15
III. Participation de l'aldostérone à divers états pathologiques.....	24
IV. Les inhibiteurs de l'aldostérone.....	27
 DEUXIEME PARTIE.....	 31
I. Les réactions de caractérisation de l'aldostérone.....	33
II. Les méthodes biologiques de dosage de l'aldostérone.....	38
III. Les méthodes physico-chimiques de dosage de l'aldostérone.....	39
IV. Les méthodes de dosage de l'aldostérone utilisant les corps marqués.....	50
 TROISIEME PARTIE.....	 53
"Techniques personnellement utilisées".	
I. Hydrolyse, extraction, purification.....	55
II. Séparation de l'aldostérone.....	58
III. Détermination quantitative.....	64

	pages
QUATRIEME PARTIE.....	91
I. Discussion des techniques étudiées.....	93
II. Résultats obtenus dans les dosages urinaires.....	100
III. Etudes des causes d'erreur dans la détermination de l'aldostéronurie.....	104
IV. Méthode proposée.....	110
CONCLUSIONS.....	115
BIBLIOGRAPHIE.....	119
